

***N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide:
Neue Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Stefanie Schmidt
aus Celle

1. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am:	12.04.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	04.06.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Schmidt, S., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Lemcke, T., Preu, L., and Kunick, C.: Development of novel dual SRC/IGF-1R inhibitors. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Jena (2009).

Schmidt, S., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Lemcke, T., Preu, L., and Kunick, C.: Novel dual SRC/IGF-1R inhibitors based on 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide parent scaffold. (Poster) Frontiers in Medicinal Chemistry, Barcelona, Spanien (2009).

Schmidt, S.: 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazides: A New Class of Multikinase Inhibitors Targeting IGF-1R, VEGFR-2 and SRC. (Vortrag) Internationale DPhG-Doktorandentagung, Pichlarn, Österreich (2009).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2007 bis Mai 2010 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und Unterstützung sowie die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Koreferats.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Proteinkinasen im Fokus der Wirkstoffentwicklung	2
2.1 Einteilung der Proteinkinasen	2
2.2 Struktur der Kinasedomäne	3
2.2.1 Struktur der katalytischen Tasche	5
2.3 Funktion und pathophysiologische Relevanz ausgewählter Proteinkinasen	9
2.3.1 c-MET	9
2.3.2 IGF-1R	10
2.3.3 VEGFR-2	11
2.3.4 TRK-B	13
2.3.5 SRC	14
2.4 Proteinkinasen als therapeutische Zielstrukturen	15
2.4.1 Hemmung der Genexpression	15
2.4.2 Hemmung von Liganden	16
2.4.3 Hemmung der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen	17
2.4.4 Hemmung der Kinasedomäne	18
2.4.4.1 Niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren	21
3 Zielsetzung	27
4 Synthesen	32
4.1 Synthese der <i>N</i> '-Aryl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 15	32
4.2 Synthese der <i>N</i> -Arylalkyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetamide 16 und 17	33
4.3 Synthese der <i>N</i> '-(2-Oxo-2-phenylethyliden)benzhydrazide 18	34
4.4 <i>N</i> '-(1 <i>H</i> -Indol-3-ylmethyliden)benzhydrazide 19	36
4.5 Synthese der <i>N</i> -[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -isoindol-2-yl)methyl]benz- amide 21	37
4.5.1 Synthese von <i>N</i> -[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -isoindol-2-yl)methyl]-2-phenyl- acetamid (21g)	37
4.6 Synthese von <i>N</i> -[(2,3-Dioxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -indol-1-yl)methyl]benzamid (22)	38

4.7	Synthese der Isoindol-Derivate 23	40
4.7.1	Thiocarbonylierung mit Lawessons Reagenz.....	40
4.7.2	Synthese von 1-Methyl-3-(3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -isoindol-1-yliden)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-on (23a)	42
4.7.3	Synthese von 3-(2-Oxo-2-phenylethyliden)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -isoindol-1-on (23b)	44
4.8	Synthese der <i>N</i> -(4-Oxo-1,4-dihydrochinolin-2-yl)amide 24	44
4.9	Synthese der 4-Aryl-1(2 <i>H</i>)-phthalazinone 25	49
4.10	Synthese der 4-Anilino-1(2 <i>H</i>)-phthalazinone 26	52
4.11	Synthese der am Phenylring modifizierten <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 27	53
4.11.1	Synthese der <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 27a-k	54
4.11.1.1	Synthese der Benzhydrazide 35h , 70b und 70c	55
4.11.2	Besonderheit in den ¹ H-NMR-Spektren der Verbindungsklassen 15 , 16 , 17 und 27	55
4.11.3	Synthese der <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 27l-q	58
4.11.3.1	Mikrowellen-induzierte Synthese	59
4.11.3.2	Suzuki-Kupplung zur Darstellung von Biphenylstrukturen	61
4.11.3.3	Mikrowellen-unterstützte Suzuki-Kupplung zur Darstellung der <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 27l-q	66
4.12	Synthese der am Indol substituierten <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 28	71
4.12.1	Synthese der <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 28a und b	71
4.12.2	Mikrowellen-induzierte Suzuki-Kupplung zur Darstellung der <i>N'</i> -Aroyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 28c-f	72
4.12.3	Strukturaufklärung von 28f mittels 2D-NMR-Spektroskopie	77
4.13	Synthese der <i>N'</i> -(4-Phenylbenzoyl)-2-(5-phenyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 29a und b	80
5	Biologische Aktivität	81
5.1	Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivitäten	81
5.2	Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Verbindungsklassen 15-19	82
5.3	Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Verbindungsklassen 21-26	84
5.3.1	Molecular Modelling	85

5.3.1.1 Allgemeine Anmerkungen zu den durchgeführten Docking-Experimenten	85
5.3.1.2 Anmerkungen zur Auswahl der c-MET-Kristallstruktur	86
5.3.1.3 Docking-Studie mit c-MET	87
5.4 Biologische Aktivität der Verbindungsklassen 27-29	88
5.4.1 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität.....	88
5.4.2 Zelluläre Aktivität ausgewählter Verbindungen	94
5.4.3 Antiproliferative Aktivität ausgewählter Verbindungen	95
5.4.4 Molecular Modelling	99
5.4.4.1 Docking-Studien mit c-MET	99
5.4.4.2 Docking-Studien mit SRC.....	101
5.4.4.3 Docking-Studien mit IGF-1R	105
6 Zusammenfassung	112
7 Summary	114
8 Experimenteller Teil	116
8.1 Allgemeines	116
8.1.1 Methoden und Geräte	116
8.1.2 Kommerziell erworbene Substanzen	119
8.2 Synthesen und analytische Daten	120
8.3 Biologische Daten.....	197
8.3.1 Proteinkinase-Assay	197
8.3.2 ELISA-Autophosphorylierungs-Assay	208
8.3.3 Tumorzelllinien-Assay.....	208
8.4 Durchführung der Docking-Studien	214
8.4.1 Docking mit FlexX	214
8.4.1.1 Struktur-basiertes virtuelles Screening.....	214
8.4.1.2 Docking-Experimente zur Untersuchung des Bindungsmodus der Verbindungen 21-26 in c-MET	216
8.4.2 Docking mit ArgusLab	217
9 Literaturverzeichnis	221

Abkürzungsverzeichnis

AAV: Allgemeine Arbeitsvorschrift, ABL: *Abelson tyrosine kinase*; ACN: Acetonitril; AKT/PKB: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, protein kinase B*; ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; Ar: Aryl; ARK5: *SNF1-like kinase 1*; ATP: Adenosin-5'-triphosphat; AXL: *AXL receptor tyrosine kinase*; BCR: *breakpoint cluster region*; BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*; ber.: berechnet; br: verbreitertes Signal; CDCl₃: Deuteriochloroform; CEL: chronische eosinophile Leukämie; CK2: *casein kinase 2*; c-KIT: *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*; CML: chronische myeloische Leukämie; COSY: *correlated spectroscopy*; δ : chemische Verschiebung; d: Dublett; DAD: *diode array detector*; DC: Dünnschichtchromatographie; DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; DEPT: *distortionless enhancement by polarization transfer*; DFSP: Dermatofibrosarcoma protuberans; DME: Dimethoxyethan; DMSO-*d*₆: Hexadeuterodimethylsulfoxid; DMSO: Dimethylsulfoxid; DNA: Desoxyribonukleinsäure; D₂O: Deuteriumoxid; DTT: Dithiothreitol; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; EI: Elektronenstoß-Ionisation; ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; EMEA: *European Medicines Agency*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase-2*; EtOAc: Ethylacetat; EtOH: Ethanol; Et₃N: Triethylamin; FAK: *focal adhesion kinase*; FDA: *US Food and Drug Administration*; FLK: *mouse fetal liver kinase*; FLT: *fms-like tyrosine kinase*; GRB2: *growth factor receptor-bound protein 2*; gef.: gefunden; GI₅₀: *growth inhibition 50%*; GIST: gastrointestinale Stromatumore; GSH: Glutathion; GST: Glutathion-S-Transferase; GTP: Guanosin-5'-triphosphat; Hepes: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure; HER: *human epidermal growth factor receptor*; HGF: *hepatocyte growth factor*; HOAc: Essigsäure; HPLC: *high performance liquid chromatography*; HRMS: *high resolution mass spectrometry*; IC₅₀: *inhibitory concentration 50%*; IGF-(R): *insulin growth factor (receptor)*; IGFBP: *insulin growth factor-binding proteins*; INTEREST: *Iressa non-small cell lung cancer trial evaluating response and survival against Taxotere*; IR: Infrarot, *insulin receptor*; IRS: *insulin receptor substrate*; ISEL: *Iressa survival evaluation in lung cancer*; IVCLSP: *in vitro cell line screening project*; J: Kopplungskonstante; KDR: *human kinase insert domain receptor*; K-RAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; λ_{max} : Wellenlänge des Absorptionsmaximums; LCK: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*; Lit.: Literatur; m: Multipllett; μ W: Mikrowelle; mAb: *monoclonal antibody*; MAPK/ERK: *p38-*

alpha mitogen activated protein kinase; MAOS: *microwave-assisted organic synthesis*; MBC: *metastatic breast cancer*; MEK: *mitogen activated protein kinase kinase*; MeOH: *Methanol*; MET: *met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)*; MTBE: *tert-Butylmethylether*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; m/z: *Masse pro Ladungseinheit*; NaOAc: *Natriumacetat*; NCI: *National Cancer Institute*; NGF: *nerve growth factor*; NMR: *nuclear magnetic resonance*; nRTK: *nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase*; NSCLC: *non small cell lung cancer*; PDB: *Protein Data Bank*; PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*; PDK: *phosphatidylinositol-dependent kinase*; Ph⁺: *Philadelphia-Chromosom-positiv*; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; pIC₅₀: *negativ dekadischer Logarithmus des IC₅₀-Wertes*; PIGF: *placenta growth factor*; PLK1: *polo-like kinase 1*; PRK1: *protein kinase C-related kinase*; q: *Quartett*; quart.: *quartär*; RAF: *v-raf murine leukemia viral oncogene homolog*; RAS: *rat sarcoma viral oncogene homolog*; RCC: *renal cell carcinoma*; RET: *rearranged during transfection*; RNA: *Ribonukleinsäure*; RP: *reversed phase*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*; RT: *Raumtemperatur*; RTK: *Rezeptor-Tyrosinkinase*; s: *Singulett*; SAK: *polo-like kinase 4*; Schmp.: *Schmelzpunkt*; SDS-PAGE: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; sek.: *sekundär*; SHC: *src homology 2 domain containing transforming protein*; SOS: *guanine nucleotide exchange factor son of sevenless*; SRC: *v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*; t: *Triplett*; TBAB: *Tetrabutylammoniumbromid*; tert.: *tertiär*; TGI: *total growth inhibition*; THF: *Tetrahydrofuran*; t_M: *Totzeit*; t_N: *Nettoretentionszeit*; TMS: *Tetramethylsilan*; TRK: *tropomyosin-related kinase*; UV: *Ultraviolett*; VEGF(R): *vascular endothelial growth factor (receptor)*; VPF: *vascular permeability factor*; WF: *Wachstumsfaktor*; YES: *v-yes Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog*.

1 Einleitung

Proteinkinasen sind zentrale Regulatoren essentieller physiologischer Vorgänge. Als Phosphatgruppen-übertragende Enzyme sind sie an der Steuerung von zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, die in komplexen Signalkaskaden ablaufen. Proteinkinasen katalysieren dabei die Phosphorylierung von entsprechenden Substratproteinen, die dadurch aktiviert oder gehemmt werden.¹ Auf diese Weise vermitteln Proteinkinasen eine Vielzahl von Ereignissen, die letztlich Einfluss auf Genexpression, Metabolismus, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose haben.²

Die Funktion der Proteinkinasen unterliegt selbst einer empfindlichen Steuerung. Kommt es zu Fehlregulationen, kann dies zu Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes, Immunerkrankungen, entzündlichen, kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen oder auch Krebserkrankungen führen.^{3,4} Dabei spielt häufig die Überfunktion von Proteinkinasen eine große Rolle. Diese kann z. B. durch Überexpression oder Mutationen bedingt sein. Darüber hinaus kann aber auch ein Verlust von Hemmfaktoren oder eine Überexpression von Aktivatoren zu einer übermäßigen Aktivität von Proteinkinasen führen.

Die Beteiligung fehlgesteuerter Proteinkinasen an der Genese, Progression und Metastasierung von Tumoren unterschiedlichster Art ist evident. Aus diesem Grund stellen Proteinkinasen ein vielversprechendes Target in der Krebstherapie dar, welches in den letzten Jahren das Interesse zahlreicher Firmen und Forschungsgruppen geweckt hat. Dabei werden verschiedene Therapieansätze verfolgt. Neben Antikörperbasierten Therapien spielen vor allem niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren eine große Rolle. Die Entwicklung von Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Neue potentielle Proteinkinase-Inhibitoren sollten synthetisiert und auf ihre inhibitorische Aktivität getestet werden.

Um die Problematik und Herausforderung der Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren zu verdeutlichen, wird zunächst einleitend auf die Einteilung, den Aufbau und die Funktion von Proteinkinasen eingegangen. Aktuelle Paradigmen der Entwicklung niedermolekularer Proteinkinase-Inhibitoren werden diskutiert und bestehende Therapieansätze sowie damit verbundene Risiken von unerwünschten Effekten

erläutert. Bereits zugelassene Proteinkinase-Inhibitoren werden vorgestellt und anschließend Grundlage und Zielsetzung dieser Arbeit erörtert.

2 Proteinkinasen im Fokus der Wirkstoffentwicklung

2.1 Einteilung der Proteinkinasen

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind im humanen Genom 518 Gene identifiziert, die für Proteinkinasen codieren. Von dieser auch als humanes Kinom bezeichneten Gruppe sind 478 Proteinkinasen sogenannte typische Kinasen, die sich durch eine ausgeprägte Homologie der Aminosäuresequenz innerhalb der Kinasedomäne auszeichnen. Die verbleibenden 40 Proteinkinasen sind aufgrund ihrer fehlenden Ähnlichkeit innerhalb der Kinasedomäne atypisch, zeigen aber auch katalytische Aktivität.⁵ Proteinkinasen katalysieren die Phosphorylierung von Substratmolekülen, indem sie das γ -Phosphat des Cosubstrats Adenosintriphosphat (ATP) auf Hydroxylgruppen in den Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin übertragen. Nach ihrer Substratspezifität lassen sich Proteinkinasen in Serin/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen einteilen. Auf Letzteren wird der Fokus dieser Arbeit liegen. Die Familie der Tyrosinkinasen wird in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und nicht-Rezeptor-assoziierte-Tyrosinkinasen (nRTK) eingeteilt. Nicht-Rezeptor-assoziierte-Tyrosinkinasen liegen cytoplasmatisch, an Zellmembranen assoziiert oder im Zellkern vor und zeigen eine deutliche Strukturvariabilität. Neben einer Kinasedomäne besitzen sie zudem häufig zusätzliche Signal- und Protein-Protein-Interaktionsdomänen.^{2,6} Die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Vertreter neben der intrazellulären Domäne mit den Eigenschaften einer Tyrosinkinase eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle besitzen und damit sowohl als Rezeptor als auch als Enzym fungieren.² Der extrazelluläre Teil besteht aus variablen Strukturmotiven, wodurch die Bindung spezifischer Liganden bedingt wird. Er ist über eine α -helikale, hydrophobe Transmembranregion mit der stark konservierten cytoplasmatischen Kinasedomäne verbunden. Durch Bindung eines Liganden kommt es zu Konformationsänderungen, die, häufig verknüpft mit einer Dimerisierung des Rezeptors, die Aktivierung der Kinasedomäne auslösen. Dies hat wiederum eine Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste innerhalb der Kinasedomäne zur Folge.⁷ Durch nachfolgende kaskadenförmige Phosphorylierungen

weiterer Proteine werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, über die Signale bis ins Zellinnere geleitet werden und die anfänglich genannten Effekte auslösen. Von besonderer Bedeutung sind der RAS/RAF/MEK/MAPK-ERK und der PI3K/AKT Signalweg.^{8,9} Diese sind schematisch in Abbildung 2-1 dargestellt und verdeutlichen die Komplexität der zellulären Vorgänge, in die Proteinkinasen involviert sind.

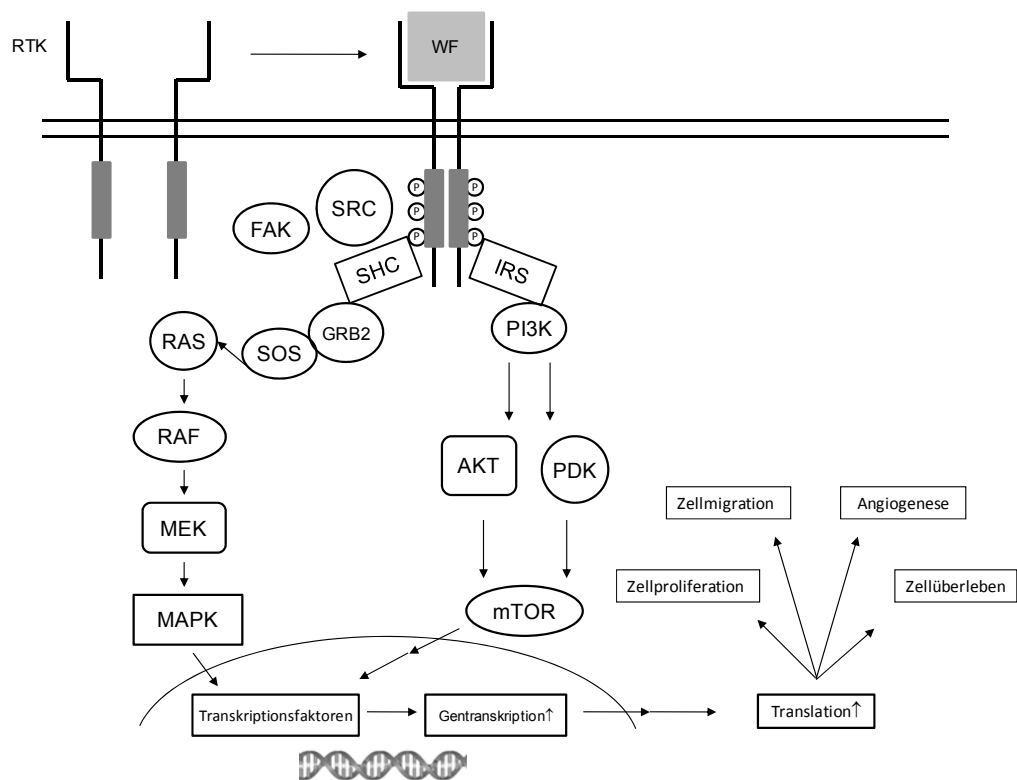


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der durch RTK induzierten Signaltransduktionswege (modifiziert nach Finn¹⁰ und Li⁸)

2.2 Struktur der Kinasedomäne

Innerhalb der Kinasedomäne findet der Phosphatgruppen-Transfer statt. Sie erfüllt somit die grundlegende Funktion der Proteinkinasen und wird auch als katalytische Domäne bezeichnet. Sie dient der Bindung und Orientierung des Cosubstrats ATP im Komplex mit zweiwertigen Magnesium- oder Manganionen sowie der Bindung und

Orientierung der entsprechenden Substrate. Unabhängig von Größe, Lokalisierung und Substratspezifität der Proteinkinasen folgt die Architektur der aus 250-300 Aminosäuren bestehenden Kinasedomäne mit Ausnahme der 40 atypischen Proteinkinasen einem einheitlichen Aufbau. Die Kinasedomäne besteht aus einer N-terminalen, hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen aufgebauten Domäne, die über die sogenannte Hinge-Region mit der etwas größeren, überwiegend aus α -Helices aufgebauten C-terminalen Domäne verbunden ist.⁵ Die Hinge-Region hat eine Art Scharnierfunktion und ermöglicht einen gewissen Grad an Flexibilität bezüglich der relativen Orientierung von N- und C-terminaler Domäne, was für die katalytische Funktion der Enzyme wichtig ist.¹¹ Zwischen den beiden Domänen ist die katalytische Tasche lokalisiert.³ Sie ist für die Phosphatgruppen-übertragende Funktion von elementarer Bedeutung und wird im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

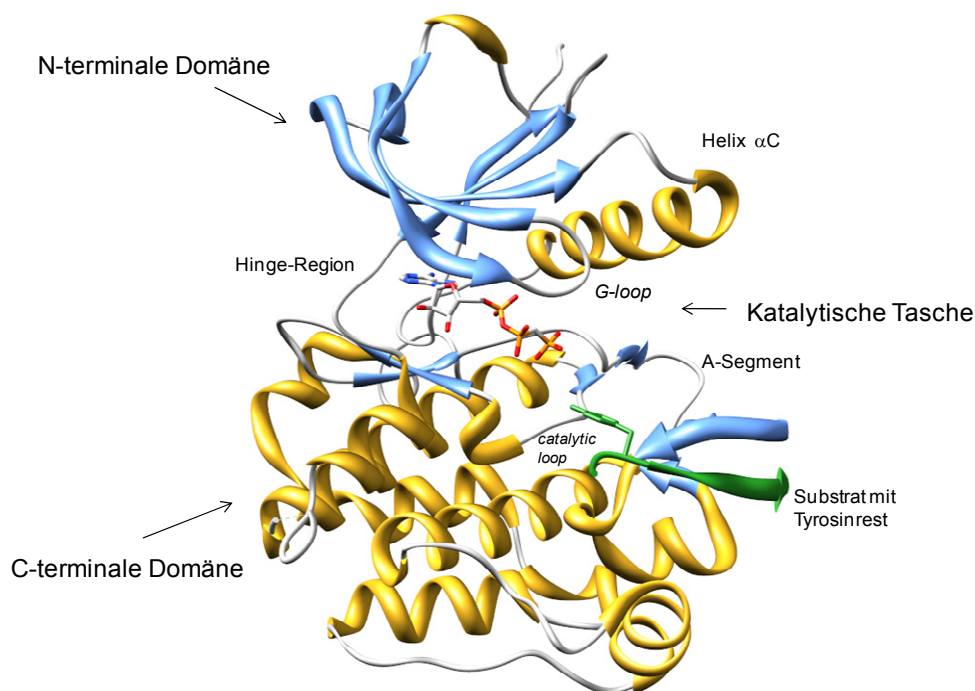


Abbildung 2-2: Struktureller Aufbau der Proteinkinasen am Beispiel von IGF-1R

(Dargestellt ist die Kristallstruktur der Kinasedomäne von IGF-1R mit einem ATP-Analogon und Substrat (PDB-ID: 1k3a)²; Visualisierung mit Chimera.¹²)

2.2.1 Struktur der katalytischen Tasche

In der katalytischen Tasche findet der Phosphatgruppen-Transfer statt. Die für den Katalyseprozess relevanten Bereiche dieser Tasche werden im Folgenden vorgestellt. Anschließend werden der genaue Bindungsmodus des Cosubstrats ATP und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Entwicklung von Inhibitoren näher beleuchtet.

Die katalytische Tasche besteht aus einer Vorder- und einer Hintertasche. Während in der vorderen Tasche u. a. die ATP-Bindestelle lokalisiert ist, befinden sich in der hinteren Tasche Elemente, die die Kinaseaktivität regulieren.³ Zwischen den beiden Taschen befindet sich der sogenannte *gatekeeper*, eine Aminosäure, die in Abhängigkeit von ihrer Größe zusammen mit einem in allen Kinasen vorkommenden konservierten Lysin den Zugang zur hinteren Tasche beeinflusst. Jede Kinase besitzt einen spezifischen *gatekeeper*, wobei es sich um kleine (Threonin, Alanin) oder große Aminosäuren (Phenylalanin, Leucin, Methionin) handelt.^{2,3,11}

In Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Kinase werden in bestimmten Bereichen der katalytischen Tasche unterschiedliche Konformationen ausgebildet. Ein für die Kinasefunktion wichtiger Abschnitt ist der sogenannte *G-loop*. Dies ist eine Glycin-reiche Sequenz innerhalb der N-terminalen Domäne. Im aktiven Zustand verankert dieser sehr flexible Bereich die nicht übertragbaren Phosphatgruppen des ATPs. Zusätzlich werden die Phosphatgruppen durch das konservierte Lysin fixiert.^{2,3} Dieses ist wiederum häufig durch eine Salzbrücke zu einem Glutamatrest in der Helix αC stabilisiert, einem weiteren für die Regulierung der Kinaseaktivität wichtigen Abschnitt im N-terminalen Teil. Man unterscheidet hier zwischen einer αC -in- und einer αC -out-Konformation, bei denen es zu einer unterschiedlichen räumlichen Orientierung des oben angesprochenen Glutamatrestes kommt.²

Wichtige Bereiche in der C-terminalen Domäne sind der *catalytic loop*, der für eine richtige Orientierung des Substrats verantwortlich ist, und das A-Segment. Letzteres setzt sich aus dem DFG-Motiv und dem sich daran anschließenden *activation-* sowie *P + 1 loop* zusammen. Beim DFG-Motiv handelt es sich um eine konservierte Sequenz der Aminosäuren Aspartat (D), Phenylalanin (F) und Glycin (G). Prinzipiell unterscheidet man zwischen einer DFG-in- und einer DFG-out-Konformation. Bei der DFG-in-Konformation zeigt der aromatische Ring des Phenylalanins in die hintere Tasche und

steht in Kontakt mit der Helix αC , während die Seitenkette des Aspartats in die ATP-Bindetasche hineinragt. Das Aspartat sorgt so für die Koordination des Magnesiumions, was für die richtige Orientierung des γ -Phosphats von entscheidender Bedeutung ist. Die DFG-in-Konformation ist eine für die Kinaseaktivität notwendige, wenn auch keine hinreichende Bedingung. Gleichzeitig ist für den aktiven Zustand einer Kinase eine αC -in-Konformation erforderlich, da nur so eine für den aktiven Zustand notwendige Salzbrücke zwischen dem konservierten Lysin, dem Aspartat des DFG-Motivs und dem Glutamat der Helix αC ausgebildet werden kann. Liegt eine DFG-in- und gleichzeitig eine αC -out-Konformation vor, handelt es sich um eine inaktive Kinase. Im inaktiven Zustand der Kinase können zudem zwei weitere Konformationen vorliegen: DFG-out oder DFG-out-like. In der DFG-out-Konformation ist der Ring des Phenylalanins zur ATP-Bindetasche ausgerichtet und die Seitenkette des Aspartats zeigt in die hintere Bindetasche. Die DFG-out-like-Konformation ähnelt dieser.^{2,3,11}

Die Konformation des A-Segments ist entscheidend für den Zugang zu den Bindestellen der Substrate. Im aktiven Zustand liegt der *activation loop* (*A-loop*) in einer offenen Konformation vor. Dadurch wird einerseits die ATP-Bindestelle zugänglich, andererseits wird eine Art Plattform ausgebildet, die der Substratbindung dient. Im inaktiven Zustand liegt der *A-loop* in Form einer Helix vor und versperrt den Zutritt zu den Bindestellen. Grundsätzlich kann ein und dieselbe Kinase meist in mehreren inaktiven Konformationen vorliegen, während es nur eine aktive Konformation gibt.³ Diese ist zudem bezüglich unterschiedlicher Kinasen sehr stark konserviert, was auf ihre gemeinsame Funktion als Phosphatgruppenüberträger zurückzuführen ist.

Die Kenntnis der genauen Bindungsweise von ATP in der Bindetasche ist für die Entwicklung von niedermolekularen Inhibitoren mit eben dieser Zielstruktur sehr hilfreich. Aus Abbildung 2-3 geht hervor, dass für die Wechselwirkung zwischen Ligand und ATP-Bindetasche fünf Regionen von Bedeutung sind: Adenin-, Zucker-, Phosphat-, Lösungsmittel-zugewandte und hydrophobe Region. Adenin-, Zucker- und Phosphat-Region sind der Vordertasche zuzuordnen. Diese Regionen sind für die Bindung von ATP relevant. In der Adenin-Region bildet ATP über sein planares Adeningerüst nach einem Donor-Akzeptor-Donor-Prinzip 3 Wasserstoffbrücken mit der Hinge-Region aus. Dazu kommen starke hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der N- und C-terminalen Domäne.⁵ Viele niedermolekulare Inhibitoren binden hier in ähnlicher Weise.³ Besonders häufig ist eine Wechselwirkung zur ersten bzw. dritten der dem

gatekeeper folgenden Aminosäure zu beobachten (gk+1 bzw. gk+3 Motiv).¹¹ Da die Adenin-bindende- bzw. Hinge-Region in ihrer Aminosäuresequenz sehr konserviert ist, ist es schwierig, in diesem Bereich Selektivität zu erreichen.

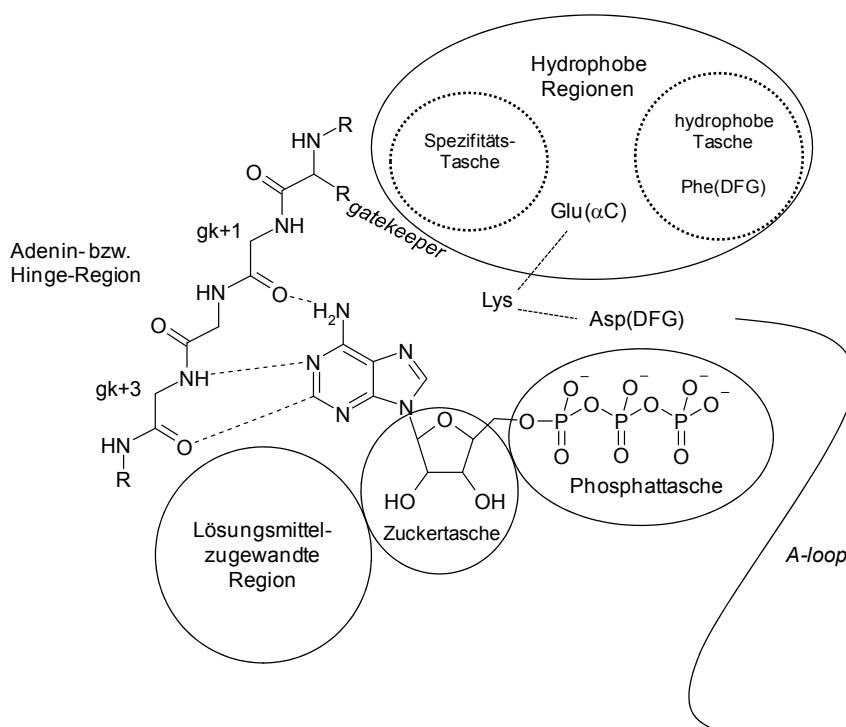


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der ATP-Bindetasche (modifiziert nach Vulpetti⁵ und Ghose¹¹)

In der vorwiegend polaren Zuckertasche wird der Riboserest des ATP gebunden. Von einer der beiden in Ribose vorkommenden Hydroxylgruppen wird eine Wasserstoffbrücke zu einem zwar durchweg polaren, aber doch zwischen den Kinasen variierenden Rest ausgebildet. An dieser Stelle lässt sich Einfluss auf Aktivität und Selektivität potentieller Inhibitoren nehmen. In der Phosphattasche wird eine Wasserstoffbrücke zwischen einer Phosphatgruppe des ATP und dem konservierten Lysin ausgebildet.⁵ Diese Region umfasst zudem den *G-loop*, die Helix αC sowie das DFG-Motiv. Dieser überwiegend polare und in der Sequenz hoch konservierte Bereich gehört zu den beweglichsten Abschnitten der Kinasedomäne und ist für die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren von großer Bedeutung. Durch Einführung entsprechend polarer Substituenten, die mit diesem Bereich wechselwirken können, ließen sich z. B. die

physikochemischen Parameter eines potentiellen Inhibitor verbessern.³ Ein weiterer, der Vordertasche zuzuordnender Bereich ist die Lösungsmittel-zugewandte Region. Sie spielt für die Bindung von ATP keine Rolle, dient aber als Eingang für potentielle Inhibitoren in die ATP-Bindetasche. Aufgrund von Sequenz- und Konformationsunterschieden zwischen den Kinasen kann dieser Bereich dazu genutzt werden, die Selektivität von Liganden zu erhöhen.^{3,5}

In der hinteren Tasche befindet sich die hydrophobe Region. Dieser Bereich kann nochmals in mehrere hydrophobe Taschen eingeteilt werden. Sie werden von ATP selbst nicht ausgefüllt, sind aber für die Entwicklung von selektiven Proteinkinase-Inhibitoren von großem Interesse, da sie in Größe und Form variieren. Eine dieser hydrophoben Taschen grenzt direkt an die Adenin-Region. Wie oben angesprochen wird der Zugang zu ihr durch das konservierte Lysin und den *gatekeeper* kontrolliert. Kleine *gatekeeper* ermöglichen den Zugang, große versperren ihn.³ Aufgrund der Möglichkeit, durch Wechselwirkung mit dieser Tasche die Selektivität eines Inhibitors zu erhöhen, wird diese Tasche auch als Spezifitäts-Tasche bezeichnet. Der *gatekeeper* limitiert jedoch nicht nur den Zugang zu dieser Tasche, er interagiert zum Teil selbst mit den Liganden. Manche niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren bilden eine Wasserstoffbrücke zum *gatekeeper* aus, wodurch die Selektivität der Inhibitoren abermals erhöht werden kann.¹¹ Eine weitere hydrophobe Tasche ist in Zusammenhang mit den Konformationen des DFG-Motivs von Bedeutung. Beim Übergang der DFG-in- in die DFG-out-Konformation rotiert das Aspartat aus der ATP-Bindetasche heraus, was gleichzeitig eine Umorientierung des Phenylalanins nach sich zieht. Hierdurch wird eine hydrophobe Tasche freigelegt, die als weitere Interaktionsmöglichkeit für Liganden zur Verfügung steht.^{3,11}

Die obigen Ausführungen verdeutlichen die zahlreichen Interaktionsmöglichkeiten zwischen Ligand und katalytischer Tasche. Nichtsdestotrotz zeigen Liganden häufig gleiche bzw. sehr ähnliche, wiederkehrende Bindungsmuster, die eine Kategorisierung in verschiedene Inhibitor-Typen ermöglichen. Auf diese Typisierung wird in Kapitel 2.4.4 näher eingegangen.

2.3 Funktion und pathophysiologische Relevanz ausgewählter Proteinkinasen

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Tyrosinkinasen, die in engen Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Formen von Krebs gebracht werden. Die hier relevanten Kinasen werden im Folgenden vorgestellt.

2.3.1 c-MET

Das 1984 erstmals entdeckte Proto-Onkogen *c-Met* kodiert für eine Proteinkinase, die zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört.¹³ c-MET ist ein Wachstumsfaktor-Rezeptor, der in zahlreichen Geweben exprimiert wird und besonders in den Membranen epithelialer und mesenchymaler Zellen lokalisiert ist.^{14,15} Der *hepatocyte growth factor* (HGF), auch *scatter factor* genannt, ist der natürliche Ligand der c-MET Rezeptor-Tyrosinkinase, die folglich auch als Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor bezeichnet wird. Wie der Name HGF vermuten lässt, ist der Einfluss auf Hepatozyten besonders ausgeprägt. Aber auch in Zellen der Niere und anderer Epithelien übernimmt HGF endokrine und parakrine Funktionen.^{15,16}

Der HGF/c-MET-Signalweg spielt bei zahlreichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. So kann die Aktivierung des Signalwegs durch Bindung von HGF ein breites Spektrum an zellulären Antworten hervorrufen. Neben Proliferation, Wachstum, Aus sprossung und Angiogenese werden auch das Überleben, die Beweglichkeit und die Migration von Zellen beeinflusst. Für die Vermittlung bzw. Steuerung von Prozessen der Wundheilung, Gewebsregeneration und Morphogenese ist dieser Signaltransduktionsweg somit von großer Bedeutung.^{15,17} Weil einige der Prozesse, in die der HGF/c-MET-Signalweg involviert ist, auch eine entscheidende Rolle bei Tumorstadium und Metastasierung spielen, werden Fehlregulationen von c-MET mit der Entstehung verschiedener Krebsformen in engen Zusammenhang gebracht. Die besondere Bedeutung von c-MET bezüglich der Metastasierung spiegelt sich auch im Namen wieder (*metastatic*).¹³ Bei erblichen und sporadischen humanen Nierentumoren, Ovarialkarzinomen, kindlichen Leberzellkarzinomen, Kopf-Hals-Plattenepithelzellkarzinomen sowie Magenkarzinomen konnten verschiedene Mutationen von c-MET identifiziert werden. Dabei handelt es sich vor allem um aktivierende Mutationen innerhalb der Tyrosinkinasedomäne. Auch eine Über-

expression des Rezeptors kann zu Tumoren führen, wie z. B. bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen beobachtet wurde.^{14,15}

Die Erkenntnis, dass der HGF/c-MET-Signalweg essentiell an der Tumorgenese beteiligt ist, macht ihn zu einem interessanten Target in der Tumorthherapie. Zurzeit befinden sich neben einem anti-HGF- (AMG102, Amgen) und einem anti-MET Antikörper (MetMAb, Genentech) 8 niedermolekulare c-MET-Kinaseinhibitoren in unterschiedlichen Phasen der klinischen Prüfung.¹⁸

2.3.2 IGF-1R

Der *insulin like growth factor receptor 1* (IGF-1R) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die ubiquitär in den meisten Zelltypen exprimiert wird. Zusammen mit dem Subtyp IGF-2R, dem *insulin receptor* (IR) und den Liganden IGF-1, IGF-2 sowie 6 weiteren hochaffinen IGF-bindenden Proteinen (IGFBP1-6) ist er Bestandteil eines Signalsystems, welches wichtige physiologische Funktionen während des Wachstums und der Entwicklung von Geweben ausübt. Eine Aktivierung der Kinase führt zur Weiterleitung von Signalen, die Einfluss auf das Zellüberleben und die Proliferation von Zellen haben. Daher ist auch ein Zusammenhang mit der Entwicklung, Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen naheliegend. Hierbei spielt u. a. die Suppression der Apoptose eine Rolle. Eine Überexpression von IGF-1R ist in Verbindung mit Brust- und Prostatakrebs, bösartigen gastrointestinalen Tumoren, Eierstock- und Gebärmutterkrebs sowie verschiedenen Formen von Hirntumoren dokumentiert.^{8,19}

Ein wesentliches Problem in der Krebstherapie ist die Entwicklung von Resistenzen gegen die entsprechenden Therapeutika. Diesbezüglich konnte in verschiedenen Untersuchungen festgestellt werden, dass die IGF-Signalachse mit der Ausbildung bzw. Verstärkung von Resistenzen korreliert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die zusätzliche Hemmung von IGF-1R die Ansprechrate von Tumoren auf eine bestimmte Behandlung erhöht.⁸

Zahlreiche niedermolekulare ATP-kompetitive und nicht ATP-kompetitive IGF-1R-Inhibitoren von unterschiedlicher chemischer Struktur befinden sich zurzeit in der Entwicklung und zeigen mitunter vielversprechende biologische Aktivität.⁸ Eine grundlegende Schwierigkeit bei der Entwicklung ist jedoch die strukturelle Ähnlichkeit zum Insulinrezeptor. Diese ist in der Aminosäuresequenz der Tyrosinkinasedomäne mit einer Homologie von 84% am stärksten ausgeprägt.²⁰ Nichtsdestotrotz zeigen IGF-1R

und IR geringe Unterschiede in ihrer Tertiärstruktur. Dies betrifft z. B. Teile des A- und G-loops und die Lösungsmittel-zugewandte Region der ATP-Bindetasche.²¹⁻²³ Trotz ihrer Ähnlichkeit üben IGF-1R und IR sehr unterschiedliche physiologische Funktionen aus. Während IGF-1R für Wachstum und Differenzierung wichtig ist, erfüllt der IR wichtige metabolische Funktionen, besonders die Glucosehomoöstase betreffend.^{24,25} Es wird vermutet, dass unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Liganden verantwortlich für die differierenden physiologischen Funktionen sein könnten. Der IR bindet Insulin hochaffin, während IGF-1 und -2 um den Faktor 10 bzw. 100 weniger stark gebunden werden. Umgekehrt verhält es sich bei IGF-1R. Dieser ist gegenüber Insulin 100fach weniger affin als gegenüber IGF-1 und -2. Darüber hinaus sind auch unterschiedliche Substratspezifitäten nicht auszuschließen. Ein weiterer Aspekt ist die unterschiedliche Gewebsverteilung der Rezeptoren. Während in Leber- und Fettzellen hauptsächlich IR exprimiert wird, ist in allen anderen Geweben überwiegend IGF-1R zu finden.^{20,25} Auch wenn das Zustandekommen dieser unterschiedlichen Funktionen noch nicht endgültig geklärt ist, so ist unumstritten, dass eine Hemmung des IR generell nicht erwünscht ist. Bei einer Behandlung mit einem Inhibitor könnte es zu schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen kommen. Unklar ist bis heute, welches Verhältnis bezüglich der inhibitorischen Aktivitäten von IGF-1R versus IR tolerierbar ist.⁸ Dieser Aspekt ist aufgrund der zum Teil stark konservierten Bereiche in Kinasen auch für die Entwicklung anderer Proteinkinase-Inhibitoren relevant.

2.3.3 VEGFR-2

Die Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen ist ein physiologisch elementarer Prozess für Organentwicklung, Differenzierung und Wachstum während der Embryogenese sowie für Wundheilung und reproduktive Funktionen im erwachsenen Organismus. Darüber hinaus sind Angio- und Lymphangiogenese auch bei der Pathogenese diverser Erkrankungen wie proliferativer Retinopathie, altersabhängiger Makuladegeneration (AMD), rheumatoider Arthritis, Psoriasis und anderer entzündlicher Erkrankungen sowie Krebs von Relevanz.²⁶ Besonders bedeutsam sind Angio- und Lymphangiogenese für Tumorwachstum und Metastasierung. Diese korrelieren direkt mit der Vaskularisierung.²⁷ Überschreitet ein Tumor eine bestimmte Größe, ist die Ausbildung neuer Blutgefäße erforderlich, um weiterhin die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten.

Die empfindliche Steuerung der oben genannten Vorgänge unterliegt dem Einfluss zahlreicher positiver und negativer Regulatoren. Hierbei handelt es sich um Wachstumsfaktoren, Cytokine, Onkogene und Hormone.^{26,28} Dem Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und seinen Rezeptoren (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, speziell was pathophysiologische Zustände betrifft. Während in gesunden Geweben VEGF und VEGFR lediglich in niedrigen Konzentrationen vorliegen, ist diese in den meisten Tumorgeweben deutlich erhöht. Zudem konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte Expression von VEGF bzw. VEGFR in Tumoren von Brust, Niere, Gehirn, Zervix und Darm mit einer schlechten Prognose einhergeht.^{26,28} Zur Familie der VEGFs gehören insgesamt 6 strukturell ähnliche Wachstumsfaktoren: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und PlGF (*placenta growth factor*).²⁷ Aufgrund ihrer die Gefäßpermeabilität erhöhenden Eigenschaften ist mitunter auch die Bezeichnung *vascular permeability factor* (VPF) üblich.²⁶ Die VEGFs üben ihre Funktion durch Bindung an die drei Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1, -2 und -3 aus, so dass es nachfolgend in unterschiedlichem Ausmaß zur Aktivierung der Kinasen und damit zur Auslösung von für die Gefäßbildung relevanten Signalkaskaden kommt. Der auf Endothelzellen exprimierte VEGFR-1 (FLT-1, *fms-like tyrosine kinase 1*) zeigt lediglich eine schwache Antwort bei Bindung der Liganden, eine physiologische Rolle als relevanter Signalüberträger ist somit noch zweifelhaft. Ohne Zweifel ist hingegen seine Beteiligung bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen.²⁸ VEGFR-2 (KDR, *human kinase insert domain receptor*; FLK-1, *mouse fetal liver kinase 1*), der ebenfalls auf Endothelzellen exprimiert wird, zeigt im Gegensatz zu VEGFR-1 eine ausgeprägte zelluläre Antwort bei Interaktion mit dem Liganden. VEGFR-2 ist durch Auslösung von Proliferation, Überleben, Sprossung und Migration von Endothelzellen und durch Erhöhung der endothelialen Durchlässigkeit wesentlich an der Angiogenese beteiligt. Eine Beteiligung an der embryonalen Lymphgefäßbildung wird vermutet.²⁸ VEGFR-3 (FLT-4, *fms-like tyrosine kinase 4*) ist spezifisch für das adulte humane lymphatische Endothelium. In der frühen Embryonalentwicklung wird er in Angioblasten und Venolen exprimiert.²⁶ VEGFR-3 kann die Effekte von VEGFR-2 potenzieren und die Angiogenese bei Inhibition von VEGFR-2 aufrechterhalten.²⁸ Die Beteiligung des VEGF/VEGFR-Systems an den oben genannten pathophysiologischen Vorgängen verdeutlicht das Interesse an diesem therapeutisch vielversprechenden Target. Ein erster Durchbruch gelang 2004 mit der Zulassung des anti-VEGF Antikörpers Bevacizumab (Avastin[®], Roche), der in Kombination mit Chemo-

therapie erfolgreich in der antiangiogenen Krebstherapie eingesetzt wird.²⁹ Auch niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren stellen aufgrund der zellspezifischen Expression der VEGFRs eine interessante Therapieoption dar. Mit Sorafenib (**7**) (Nexavar®, Bayer) und Sunitib (**8**) (Sutent®, Pfizer) sind derzeit zwei Multiproteinkinase-Inhibitoren in Europa zugelassen, die u. a. gegen VEGFR gerichtet sind. Zahlreiche weitere niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren unterschiedlicher chemischer Struktur und Biologicals befinden sich in der Entwicklung und zeigen mitunter aussichtsreiche Ergebnisse.³⁰

2.3.4 TRK-B

TRK-B (*tropomyosin-related kinase B*) gehört zusammen mit den hoch homologen Isoformen TRK-A und TRK-C zu einer Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen, die als Rezeptoren für Neurotrophine (NT) dienen. Dabei handelt es sich um lösliche Wachstumsfaktoren, die mit unterschiedlichen Affinitäten an die Rezeptorisoformen binden. NGF (*nerve growth factor*) aktiviert TRK-A, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und NT-4/5 aktivieren TRK-B und NT-3 aktiviert TRK-C.^{9,31} Das Neurotrophin-System ist wichtig für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems. In allen peripheren, sensorischen Neuronen und neuroektodermen Geweben wird mindestens eine Form der TRK-Rezeptoren exprimiert.³² Sie regulieren die Expression und Aktivität von Proteinen der Apoptose-relevanten Signalwege und haben damit Einfluss auf das Überleben von Neuronen. Darüber hinaus sind sie an der Aktivierung von Signalwegen beteiligt, die die neuronale Differenzierung und das Wachstum regulieren. In Abhängigkeit vom Zelltyp kann die Aktivierung ein und derselben Rezeptor-Tyrosinkinase unterschiedliche Effekte vermitteln. In ein und derselben Zelle können wiederum durch die verschiedenen Rezeptoren unterschiedliche Effekte vermittelt werden.⁹ Im gesunden, erwachsenen Organismus werden die Rezeptoren lediglich in geringem Maße außerhalb des Nervensystems exprimiert. In vielen Formen von Krebs einschließlich Neuroblastomen, Ovarial-, Prostata- und Kolorektalkrebs kann jedoch eine Überexpression, Aktivierung, Amplifizierung und/oder Mutation der TRK-Rezeptoren festgestellt werden.³¹

2.3.5 SRC

SRC (*v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*) gehört zusammen mit 10 weiteren Mitgliedern zur größten Familie von nicht-Rezeptor-assoziierten-Tyrosinkinasen.³³ *Src* ist das wohl älteste bekannte Proto-Onkogen. Es ist auf ein 1911 von Peyton Rous identifiziertes Virus zurückzuführen, das in gesunden Hühnern die Bildung von Tumoren auslöste (Rous-Sarkom-Virus).¹⁰ Hunter et al.³⁴ beschrieben 1980 das Produkt dieses Gens als erstes Protein, bei dem eine Tyrosinkinaseaktivität gezeigt werden konnte. SRC wird in den meisten Zellen exprimiert und liegt dort an Membranen assoziiert vor. SRC kann durch cytoplasmatische Proteine wie FAK (*focal adhesion kinase*), aber auch durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie IGF-1R aktiviert werden und dient als essentieller Signalvermittler zahlreicher Signaltransduktionswege, die Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Motilität und Zelladhäsion haben.^{10,33}

Eine Hyperaktivität von SRC ist mit verschiedenen Krebserkrankungen wie z. B. Kolonkarzinomen und Brustkrebs assoziiert.³⁵ Dabei spielt auch die Bildung von Knochenmetastasen eine bedeutende Rolle, da SRC ferner in die Steuerung von Osteoklastenaktivierung und Knochenresorption involviert ist. Eine erhöhte Aktivität von SRC kann auf eine erhöhte Transkriptionsrate, auf fehlregulierte, in der Kaskade vorgeschaltete Kinasen oder auch eine reduzierte Expression negativer SRC-Regulatoren zurückzuführen sein. Es konnte zudem gezeigt werden, dass SRC in hypoxischen Geweben eine erhöhte Bildung von VEGF-mRNA auslöst und somit auch in angiogene Prozesse verwickelt ist. Auch wenn vieles darauf hinweist, dass die SRC-Aktivität allein keine onkogenen Veränderungen verursachen kann, stellt SRC ein begehrtes Target in der Krebstherapie dar. Eine kombinierte Hemmung von SRC und anderen relevanten Zielstrukturen könnte synergistische Effekte haben und damit von großem therapeutischen Nutzen sein.¹⁰

2.4 Proteinkinasen als therapeutische Zielstrukturen

Dass Proteinkinasen aufgrund ihrer Beteiligung an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen ein vielversprechendes therapeutisches Target darstellen, wurde in den vorherigen Kapiteln verdeutlicht. Dabei bieten sie wegen ihrer Komplexität viele therapeutische Angriffsmöglichkeiten. Verschiedene Therapiestrategien, die der Hemmung der Kinasen bzw. der Unterbrechung der durch sie vermittelten Signalwege dienen, werden im Folgenden vorgestellt.

2.4.1 Hemmung der Genexpression

Fusionsproteine sind für maligne Zellen spezifische chimäre Proteine, bei denen Tyrosinkinasen einen der Bestandteile bilden. Fusionsproteine sind auf Hybridgene zurückzuführen, die wiederum durch Translokationen entstehen. Die Bildung solcher Fusionsproteine kann mit Hilfe von DNA-Bindungsproteinen gehemmt werden. Es handelt sich dabei um Peptide, die vorzugsweise an Onkogene der DNA binden. Durch die Hemmung dieser für Tumorzellen spezifischen Gene werden deren Transkription und damit die Bildung der entsprechenden Proteine unterdrückt. Erste Erfolge konnten mit einem aus drei Zink-Finger-Motiven bestehenden Bindungsprotein gegen die Sequenz des BCR-ABL Fusionsproteins erzielt werden, ein für die chronische myeloische Leukämie charakteristisches Fusionsprotein.⁷ Es ist auf das sogenannte Philadelphia-Chromosom zurückzuführen, welches durch Translokation der Chromosomen 9 und 22 entsteht. Die Bruchstellen liegen im Bereich der Gene *c-Abl* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*), das für eine Tyrosinkinase kodiert, und *Bcr* (*breakpoint cluster region*). Das daraus resultierende Fusionsgen führt zur Bildung eines Genprodukts, bei dem es sich um eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase handelt, die die Proliferation von myeloischen Zellen stimuliert. Das Philadelphia-Chromosom kann bei Leukämieerkrankungen wie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sowie der akuten und chronischen myeloischen Leukämie (AML bzw. CML) vorhanden sein.³⁶ Die CML kann in drei Stadien eingeteilt werden. Sie beginnt mit einer ca. 3 bis 5 Jahre andauernden chronischen Phase, meist gefolgt von der akzelerierten Phase (6 bis 18 Monate). Schließlich kommt es zur Blastenkrise, die vom Verlauf her einer akuten Leukämie entspricht. Sie dauert ca. 3 bis 6 Monate und kann sich auch direkt an die chronische Phase anschließen.³⁷ Neben DNA-Bindungsproteinen stehen für die

jeweiligen Phasen weitere Therapeutika zur Verfügung, auf die an entsprechender Stelle eingegangen wird.

Eine weitere Möglichkeit die Genexpression zu unterdrücken, bietet der Einsatz von katalytisch aktiven RNA-Molekülen, sogenannten Ribozymen. Diese sind in der Lage gezielt die mRNA zu spalten und dadurch die Genexpression zu verhindern. Auch sie konnten z. B. erfolgreich gegen das BCR-ABL Fusionsprotein sowie Wachstumsfaktoren und –rezeptoren wie HGF und c-MET eingesetzt werden.^{7,38}

Eine weitere Strategie stellen Antisense-Techniken dar. Hierbei werden Antisense-Oligonukleotide, bei denen es sich um rekombinante RNA- oder DNA-Sequenzen definierter Länge handelt, komplementär an eine für Kinasen codierende mRNA gebunden und verhindern dadurch deren Translation.^{7,19}

2.4.2 Hemmung von Liganden

Die Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosinkinase erfolgt durch Bindung eines für sie spezifischen Liganden. Wird diese Interaktion verhindert, können somit auch pathologisch aktivierte Signaltransduktionswege unterbrochen werden. Eine Möglichkeit, Liganden von der Bindung an ihren Rezeptor abzuhalten, bietet der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAb). Bevacizumab (Avastin®, Roche) ist ein rekombinanter, humanisierter Antikörper von VEGF, der erste Wirkstoff, dem das Prinzip der Angiogenesehemmung zugrunde liegt. Bevacizumab ist in Kombination mit 5-Fluorouracil seit 2004 (USA) bzw. 2005 (Europa) zur Erst-Linien-Behandlung von Patienten mit metastasiertem Kolorektalkarzinom zugelassen. Aufgrund vielversprechender Therapieerfolge und guter Studienlage wurde die Zulassung seitdem auf zahlreiche weitere Indikationen wie Brust- und nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, Glioblastome und Nierenzellkarzinome ausgeweitet.³⁹

Neben monoklonalen Antikörpern können Liganden auch durch Köder-Rezeptoren (*decoy receptors, traps*) neutralisiert werden.⁴⁰ VEGF Trap ist ein von Regeneron und Bayer HealthCare entwickelter Antiangiogenesehemmer, der sich zurzeit in verschiedenen klinischen Prüfungen für diverse Indikationsgebiete wie Krebs oder auch Makuladegeneration befindet.^{41,42} VEGF Trap enthält bestimmte Domänen des humanen VEGFR-1 und -2, die am Fc Segment von humanem IgG1 fixiert sind.^{42,43} VEGF Trap zeigt deutlich höhere Affinitäten zu zirkulierendem VEGF als monoklonale Antikörper.⁴⁰

2.4.3 Hemmung der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Nicht nur die Liganden selbst, auch die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle kann mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern blockiert werden. Cetuximab (Erbix[®], Merck) und Panitumumab (Vectibix[®], Amgen) sind selektive mAb gegen HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*), die durch Interaktion mit der extrazellulären Ligandenbindungsstelle die Liganden-induzierte Aktivierung der Kinase verhindern. HER1 gehört neben HER2, HER3 und HER4 zu einer Familie von epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFRs), die in vielen Krebsarten überexprimiert werden und dort vor allem angiogene und antiapoptotische Effekte haben. Cetuximab ist ein chimärer IgG1 Antikörper, der mit deutlich höherer Affinität an HER1 bindet als die natürlichen Liganden. Durch Bindung von Cetuximab an den Rezeptor wird dessen Internalisierung induziert, gefolgt vom Abbau des Rezeptors. Durch diese Down-Regulation stehen weniger Rezeptoren an der Zelloberfläche zur Verfügung, wodurch folglich auch die Aktivierung der durch HER1-induzierten Signaltransduktionswege minimiert wird. Cetuximab ist seit 2004 zur Behandlung von Patienten mit HER1-exprimierendem, metastasierendem Kolorektalkarzinom in Kombination mit Irinotecan oder als Monotherapie zugelassen. Die Zulassung wurde 2006 für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich bei Platin-resistenten Patienten als Monotherapie sowie in Kombination mit Strahlentherapie für fortgeschrittene Erkrankungen erweitert.⁴⁴

Panitumumab ist ein weiterer, jedoch vollständig humanisierter IgG2 Antikörper gegen HER1. Da er kein Mausprotein mehr enthält, ist er mit Ausnahme von dermatologischen Nebenwirkungen ausgesprochen gut verträglich. Panitumumab ist seit 2006 (USA) bzw. 2007 (Europa) für die Behandlung von Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom zugelassen, die keine Mutation des Wildtyp-Gens *K-Ras* aufweisen. Das Produkt dieses Gens ist K-RAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), ein GTP-bindendes Protein, das für Zellwachstum und Survival-Signalwege von Bedeutung ist. In etwa 30-50% der Kolorektalkarzinome ist dieses Gen mutiert, was zu einer dauerhaften Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt. Trotz der zunächst vielversprechenden Ergebnisse von Anti-EGFR mAb konnte inzwischen in vielen klinischen Studien gezeigt werden, dass sie letztlich nur einen geringen Vorteil gegenüber supportiven Maßnahmen zeigen. Aufgrund von Kosten-Nutzen-Analysen wird daher der Einsatz dieser Therapeutika in Zukunft reduziert werden.^{44,45}

Trastuzumab (Herceptin[®], Roche) ist ein monoklonaler, humanisierter IgG Antikörper, der sich gegen die extrazelluläre Domäne von HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) richtet. Trastuzumab ist seit 1998 (USA) bzw. 2000 (Europa) für die Monotherapie oder in Kombination mit Paclitaxel/Docetaxel oder einem Aromatasehemmer zur Behandlung von metastasierenden Mammakarzinomen zugelassen. Nach chirurgischer Behandlung, Chemo- und Strahlentherapie kann Brustkrebs auch im Frühstadium mit Trastuzumab behandelt werden. Generell ist Trastuzumab nur für die Therapie von Tumoren geeignet, die HER2 exprimieren. Dies gilt für etwa 25% der diagnostizierten Mammakarzinome.⁴⁶⁻⁴⁸

Auch mit Hilfe von antagonistischen Ligand-Fragmenten kann die Bindung eines natürlichen Liganden an seinen Rezeptor verhindert werden. NK4 ist ein synthetisches Molekül, welches bestimmte Teile von HGF, dem Liganden von c-MET, enthält. NK4 konkurriert mit HGF um die Bindung am Rezeptor und kann auf diese Weise die Induktion der durch HGF/c-MET vermittelten Signaltransduktionswege verhindern.⁴⁹

Bei Rezeptor-Tyrosinkinasen ist die Dimerisierung des Rezeptors für die Aktivierung der Kinasedomäne und die sich anschließende Signalkaskade von grundlegender Bedeutung. Für die Dimerisierung sind u. a. bestimmte extrazelluläre Domänen, wie z. B. die sogenannte Sema-Domäne des c-MET Rezeptors, wichtig. Die Hemmung solcher Domänen stellt eine weitere Therapiestrategie dar.^{50,51}

2.4.4 Hemmung der Kinasedomäne

Bei diesem Ansatz geht es primär um die Hemmung der ATP-Bindung und damit um die Hemmung der enzymatischen Aktivität. Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, Enzymaktivitäten zu hemmen, wobei man zwischen reversibler und irreversibler Hemmung unterscheidet. Bei einer irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor kovalent an das Enzym und schaltet es dadurch dauerhaft aus. Bei einer reversiblen Hemmung unterscheidet man zwischen kompetitiven und nichtkompetitiven Inhibitoren. Letztere binden typischerweise an den Enzym-Substrat-Komplex, jedoch nicht am aktiven Zentrum, sondern an einer räumlich anderen Stelle. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, welches dadurch in seiner katalytischen Aktivität abgeschwächt wird. Kompetitive Inhibitoren binden am aktiven Zentrum des freien Enzyms und konkurrieren mit dem Substrat oder Cosubstrat in Abhängigkeit ihrer Bindungsaffinitäten

um die Bindungsstelle. Durch Erhöhung der Konzentration des Substrats oder Cosubstrats kann ein kompetitiver Inhibitor wieder von der Bindungsstelle verdrängt werden.⁵²⁻⁵⁴

Neben dieser Einteilung der Inhibitoren in irreversibel, kompetitiv und nichtkompetitiv, ist auch eine Klassifizierung in Typ I, II und III Inhibitoren möglich.^{55,56} Einzelheiten zu dieser Art der Einordnung werden weiter unten beschrieben.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen ATP-kompetitive Inhibitoren. Eine der grundlegenden Schwierigkeiten bei der Entwicklung niedermolekularer, ATP-kompetitiver Inhibitoren besteht in den hohen intrazellulären ATP-Konzentrationen, mit denen potentielle Inhibitoren konkurrieren müssen. Deshalb sind ausgesprochen hohe Bindungsaffinitäten notwendig, um gegen ATP als natürlichen Liganden zu bestehen.⁵⁷ Die ausgeprägte Sequenzhomologie der Kinasedomäne und insbesondere der ATP-Bindetasche ist ein weiteres Problem. In den letzten Jahren bestand ein besonderes Interesse an der Entwicklung möglichst selektiver Inhibitoren. Auf diese Weise sollte das Risiko von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen minimiert werden. Dies ist in Anbetracht der Omnipräsenz von Proteinkinasen im Organismus ein nicht zu unterschätzender Aspekt. Da eine Therapie mit Proteinkinase-Inhibitoren zudem häufig über längere Zeiträume erfolgt, kann sich selbst die Hemmung einer einzigen Kinase auf viele physiologische Vorgänge auswirken. So kann es z. B. bei einer Hemmung IGF-1R neben einem Anstieg der Sekretion von Wachstumshormonen zu einer Abnahme der Knochendichte kommen. Auch Effekte auf das zentrale und periphere Nerven- sowie das Herz-Kreislaufsystem sind denkbar. Ebenso naheliegend sind Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes.⁸ Aus diesem Beispiel lässt sich gut ableiten, dass die Risiken bei Hemmung mehrerer Kinasen noch weitaus umfassender sind. Dieser Aspekt spricht klar für die Entwicklung möglichst selektiver Inhibitoren. Es stellt sich jedoch die Frage, ob es bei 518 heute bekannten Kinasen generell überhaupt möglich ist, lediglich eine einzige bzw. wenige von ihnen gezielt zu hemmen. Es ist nicht selten, dass aus einem zunächst als selektiv titulierten Inhibitor im Verlauf seiner Entwicklung ein nicht-selektiver bzw. Multikinase-Inhibitor resultiert, da sich eine scheinbare Selektivität häufig durch die in den jeweiligen Assays getesteten Kinasen ergibt.⁵⁸ Umfassende Aussagen über das Inhibitionsprofil eines potentiellen Hemmstoffs erfordern also ein Screening an möglichst vielen Kinasen.

Mit zunehmender Kenntnis über die genaue Struktur der Kinasedomäne, insbesondere der katalytischen Tasche, und den Bindemodus von ATP, ist es durchaus möglich, selektive Inhibitoren zu entwickeln. Dass bestimmte Bereiche in der katalytischen Tasche, die ATP selbst nicht ausfüllt, zur Erhöhung der Selektivität ausgenutzt werden können, wurde bereits in Abschnitt 2.2 angesprochen. Besonders bedeutsam ist in diesem Zusammenhang der generelle Aktivitätszustand der Kinase. Einige der derzeit bekannten niedermolekularen Proteinkinase-Inhibitoren binden an die ATP-Bindetasche der aktiven, sehr konservierten DFG-in-Konformation der Kinase und interagieren hierbei mit Aminosäuren der Hinge-Region. Diese Inhibitoren werden auch als Typ I Inhibitoren bezeichnet.^{55,56} Die ausgeprägte Konservierung der ATP-Bindetasche erschwert in diesem Fall die Entwicklung selektiver Inhibitoren. Aus diesem Grund wird verstärkt nach Inhibitoren mit alternativen Bindungsmodi gesucht, die die Konformationsvariabilität der Kinasen ausnutzen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Übergang einer DFG-in- in eine DFG-out-Konformation, da hierbei der Zugang zu einer hydrophoben, von ATP nicht ausgenutzten Tasche ermöglicht wird (vgl. Kapitel 2.2.1). Diese allosterische Tasche wird von Typ III Inhibitoren ausgenutzt, die auf diese Weise die DFG-out-Konformation stabilisieren und das Gleichgewicht zugunsten der inaktiven Konformation verschieben.⁵⁵ Typ II Inhibitoren nutzen ebenfalls diese allosterische Tasche, interagieren darüber hinaus aber auch noch mit der Hinge-Region in der ATP-Bindetasche.^{55,56} Nach Bogoyevitch und Fairlie werden Typ II und Typ III Inhibitoren auch als allosterische Inhibitoren bezeichnet.⁵⁷ Neben dem höheren Grad an Selektivität, der sich durch Einsatz von Typ II und III Inhibitoren erzielen lässt, haben diese Inhibitoren häufig auch eine höhere Bindungsaffinität zu der inaktiven Form der Kinase als ATP.^{4,57,59} Dadurch wird der oben angesprochene Konkurrenzkampf zugunsten des Inhibitors verschoben. Auch wenn pathophysiologische Zustände meist mit konstitutiv aktiven Proteinkinasen assoziiert sind, schließt das die Existenz von inaktiven Formen der Kinasen in den erkrankten Geweben nicht aus. Dass der Ansatz der Hemmung der DFG-out-Konformation einer Kinase durchaus erfolgsversprechend ist, spiegelt sich in den Bindungsmodi der bereits zugelassenen Proteinkinase-Inhibitoren wieder, von denen ein Großteil an eine inaktive Konformation der Kinasen bindet.⁵²

Aus einem anderen Blickwinkel betrachtet, erfordert der erfolgreiche therapeutische Einsatz eines selektiven Inhibitors eine genaue Kenntnis des Onkogens bzw. der

Zielstruktur, von der ein Tumor abhängt.⁴⁸ Nach Stand der Wissenschaft ist dies in vielen Fällen unrealistisch, zumal die Entwicklung und Progression eines Tumors meist multifaktoriell bedingt ist. Des Weiteren ergibt sich mit dem Einsatz hoch selektiver Inhibitoren durch die Komplexität der Signaltransduktionswege das Problem, dass über alternative Signalwege eine Hemmung umgangen und ein Inhibitor in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt werden kann.⁵⁸ In diesem Zusammenhang steigt auch die Gefahr der Resistenzbildung, woraus erhöhte Rezidivraten resultieren. Aus diesen Gründen hat in jüngster Vergangenheit ein Paradigmenwechsel stattgefunden, bei dem ein verstärktes Interesse an der Entwicklung von Multiproteinkinase-Inhibitoren im Vordergrund steht. Durch gezielte, gleichzeitige Hemmung relevanter Kinasen kann die Wirksamkeit einer Therapie erhöht und das Auftreten von Resistenzen vermieden werden.

Multiproteinkinase-Inhibitoren können grundsätzlich mit Hinblick auf eine horizontale oder eine vertikale Strategie entwickelt werden. Bei einer horizontalen Strategie geht es darum, durch gezielte Hemmung bestimmter Kinasen mehrere Voraussetzungen für das Tumorwachstum, wie Hyperproliferation, Apoptoseunterdrückung, Angiogenese und Metastasierung gleichzeitig zu hemmen. Bei einer vertikalen Strategie werden hingegen Kinasen innerhalb einer Signaltransduktionskette inhibiert, wodurch ein Ausweichen auf alternative Signalwege verhindert werden soll. Hinter diesem Ansatz der sogenannten „selektiven Nichtselektivität“ steht die Philosophie, zwischen einer für die Wirksamkeit notwendigen Nichtselektivität und einer für die Sicherheit erforderlichen Selektivität der Inhibitoren die richtige Balance zu finden.⁵⁸

2.4.4.1 Niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren

Niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren sind ein wesentlicher Bestandteil der Entwicklungsprogramme zahlreicher Pharmafirmen.⁵⁸ Die Intensität, mit der die Entwicklung neuer Proteinkinase-Inhibitoren vorangeht, spiegelt sich nicht nur in den 9 Tyrosinkinase-Inhibitoren wieder, die in den letzten 8 Jahren in Europa und den USA zugelassenen wurden, sondern auch in den mehr als 200 Kinase-Inhibitoren, die sich zurzeit in unterschiedlichen Phasen der klinischen Entwicklung befinden.⁶⁰

Mit Imatinib (**1**) (Glivec[®], Novartis) erhielt 2001 der erste niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitor die Zulassung in den USA und Europa. Imatinib wurde ursprünglich als selektiver Inhibitor der Wachstumsfaktor-Rezeptoren PDGFR α und β (*platelet-derived growth factor receptor*) entwickelt, welche eine wichtige Rolle bei Zellpro-

liferation, -migration, Wundheilung und Angiogenese spielen. Sie werden u. a. mit Erkrankungen wie chronischer eosinophiler Leukämie (CEL) oder Dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP), einer Krebserkrankung des Unterhautgewebes, in Verbindung gebracht. Es stellte sich jedoch heraus, dass auch strukturell verwandte Tyrosinkinasen wie BCR-ABL und c-KIT von Imatinib gehemmt werden.⁵⁸ Die Rolle von BCR-ABL bei chronischer myeloischer Leukämie wurde bereits unter 2.4.1 besprochen. Imatinib erhielt die Zulassung zunächst für die Behandlung von Patienten mit Philadelphia-Chromosomen-positiver (Ph+) CML in der chronischen Phase, wenn eine Therapie mit Interferon alpha zuvor nicht erfolgreich war, sowie zur Behandlung der akzelerierten Phase und der Blastenkrise.⁶¹ Darüber hinaus wird Imatinib auch zur Therapie anderer Blutkrebserkrankungen wie der Ph+ ALL und der oben angesprochenen CEL sowie zur Behandlung des DFSP eingesetzt.⁵⁸ Gastrointestinale Stromatumore (GIST) werden mit einer erhöhten Aktivität des Stammzellfaktor-Rezeptors c-KIT in Verbindung gebracht. Nach entsprechend positiv verlaufenen klinischen Studien erfolgte deswegen eine Erweiterung der Zulassung von Imatinib zur adjuvanten Therapie von Patienten mit KIT-positiven, nicht resezierbaren oder metastasierenden GIST.^{61,62}

Zunächst wurde basierend auf kinetischen Untersuchungen vermutet, dass es sich bei Imatinib um einen klassischen ATP-kompetitiven Inhibitor handelt. Imatinib bindet jedoch an die DFG-out-Konformationen der Kinasen und ist somit nach Bogoyevitch⁵⁷ und Klüter⁵⁵ per definitionem ein allosterischer bzw. Typ II Inhibitor. Der große Erfolg von Imatinib ist unbestritten. Trotz anfänglicher Skepsis hat er viele Pharmafirmen darin bestärkt, die Entwicklung neuer Proteinkinase-Inhibitoren weiterhin intensiv zu verfolgen. Der Erfolg wird inzwischen jedoch getrübt, da zunehmend Resistenzen gegenüber Imatinib auftreten.⁴⁸ Besonders bei Patienten in der Blastenkrise treten gehäuft Mutationen der BCR-ABL Kinase auf. Diese können u. a. zu einem Austausch der ursprünglichen, kleinen *gatekeeper*-Aminosäure Threonin gegen das wesentlich größere Isoleucin führen. Daraus resultiert ein deutlicher Aktivitätsverlust von Imatinib, da der *gatekeeper* Threonin an der Bindung von Imatinib in der ATP-Bindetasche beteiligt ist.⁵⁸

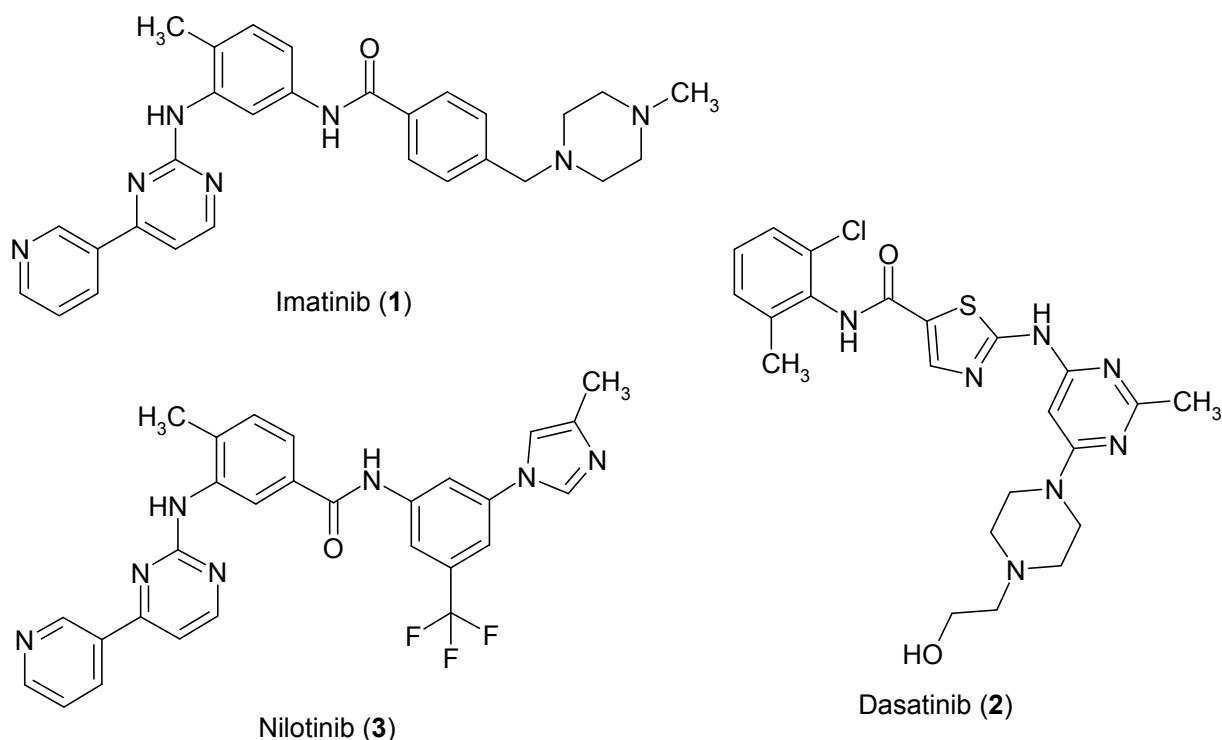


Abbildung 2-4: Multiproteinkinase-Inhibitoren zur Therapie verschiedener Leukämieformen

Die entsprechenden Resistenzen stellen eine immer größer werdende Herausforderung bezüglich der Entwicklung neuer niedermolekularer Proteinkinase-Inhibitoren dar. Mit der Zulassung von Dasatinib (**2**) (Sprycel[®], Bristol-Myers Squibb) im Jahr 2006 konnte diesbezüglich ein erster Erfolg verzeichnet werden. Dasatinib hemmt nicht nur verschiedene Mutanten der BCR-ABL Kinase, sondern auch Kinasen der SRC Familie (SRC, LCK, YES und FYN), Zielstrukturen also, die in die durch BCR-ABL vermittelten Signaltransduktionswege involviert sind.^{48,58} Durch diese vertikale Strategie können die Signaltransduktionswege effektiv unterdrückt und das Ausweichen auf alternative Signalwege vermieden werden. Dasatinib ist für die Behandlung von Patienten in allen Stadien der CML sowie der Ph⁺ ALL zugelassen, die eine Resistenz oder Unverträglichkeit gegenüber Imatinib zeigen.⁶³

Mit dem Multikinase-Inhibitor Nilotinib (Tasigna[®], Novartis) steht seit 2007 für die Behandlung der chronischen und akzelerierten Phase der CML noch eine weitere Alternative bei Imatinib-Resistenz zur Verfügung. Nilotinib (**3**) richtet sich wie Imatinib

gegen BCR-ABL, c-KIT und PDGFR und bindet ebenfalls an die DFG-out-Konformationen.^{37,52}

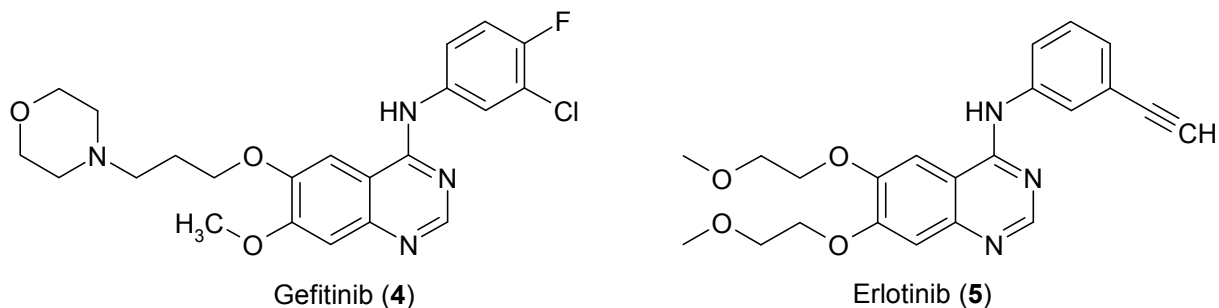


Abbildung 2-5: Selektive HER1-Inhibitoren

Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) gehört zu den Krebsarten mit der höchsten Mortalität. Er wird mit einer erhöhten HER1 Expression in Verbindung gebracht, die zudem mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.⁶⁴ Zwei Proteinkinase-Inhibitoren mit eben dieser Zielstruktur sind Gefitinib (4) (Iressa[®], AstraZeneca) und Erlotinib (5) (Tarceva[®], Roche). Sie werden im Rahmen einer personalisierten Krebstherapie eingesetzt, die erstmals zur Behandlung von Mammakarzinomen etabliert wurde. Durch vorherige Bestimmung eines Biomarkers, in diesem Fall ein durch Mutation aktivierter HER1, können Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf die Therapie gemacht werden.⁶⁵ Gefitinib wurde 2003 in den USA im Rahmen eines beschleunigten Zulassungsverfahrens zur Monotherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem NSCLC zugelassen, wenn zuvor eine Platin-basierte Therapie und die Behandlung mit Docetaxel fehlgeschlagen sind. Das beschleunigte Zulassungsverfahren erforderte nachfolgend durchgeführte Studien, um einen klinischen Benefit bei NSCLC nachzuweisen.⁶⁶ U. a. sorgte jedoch die ISEL Studie (*Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer*) zunächst für einen Rückschlag, was dazu führte, dass die FDA (*US Food and Drug Administration*) 2005 den Gebrauch von Gefitinib auf Patientengruppen einschränkte, die sich entweder in klinischen Studien befanden oder aber in vorangegangenen Studien deutlich von einer Therapie mit Gefitinib profitierten.^{64,67} Nicht nur diese Daten, sondern auch die 2004 erteilte Zulassung für Erlotinib, welches in Studien besser abschnitt, sorgten für einen Rückzug

von Gefitinib aus dem routinemäßigen Einsatz bei NSCLC.^{64,68} Es stellte sich jedoch heraus, dass die enttäuschenden Ergebnisse der ISEL Studie nicht zuletzt auf ein ungünstiges Patientenkollektiv zurückzuführen sind. Auf Basis der INTEREST Studie (*Iressa Non-small cell lung cancer Trial Evaluating Response and Survival against Taxotere*) konnte letztlich eine klare Überlegenheit von Gefitinib gegenüber der Standardtherapie gezeigt werden. Aufgrund der sich geänderten Studienlage erhielt Gefitinib 2009 auch in Europa die Zulassung.^{64,65} Die Zulassung von Erlotinib wurde 2005 auf die Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem, nicht resezierbarem oder metastasierendem Bauchspeicheldrüsenkrebs in Kombination mit Gemcitabin erweitert.⁶⁹

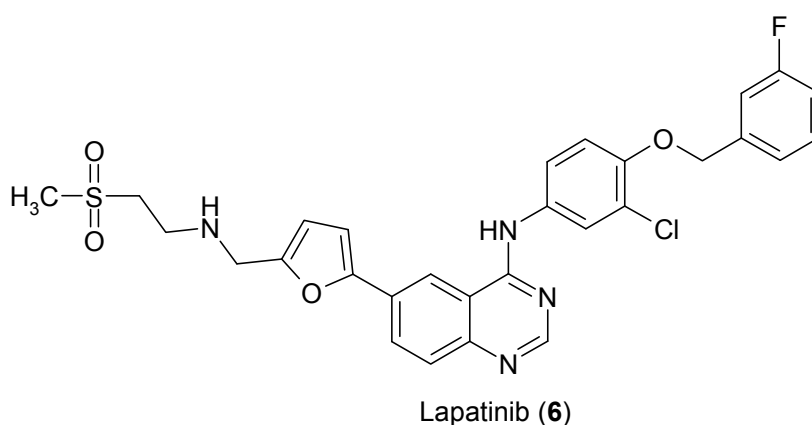


Abbildung 2-6: Dualer HER1/HER2-Inhibitor zur Therapie von metastasierendem Brustkrebs

Lapatinib (**6**) (Tykerb[®], GlaxoSmithKline) ist ein dualer Inhibitor von HER1 und HER2. Lapatinib wurde 2007 von der FDA bzw. 2008 von der EMEA (*European Medicines Agency*) in Kombination mit Capecitabin für die Behandlung von Patientinnen mit fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs (MBC) zugelassen, der HER2-positiv ist. Eine Therapie mit Lapatinib erfolgt dann, wenn zuvor bereits eine Behandlung mit einem Anthracyclin oder einem Taxan und Trastuzumab erfolgt ist. Die progressionsfreie Zeit bei MBC konnte durch eine Therapie mit Lapatinib signifikant verbessert werden. Ob auch weitere bösartige Tumore, die HER1 und/oder HER2 überexprimieren, erfolgreich mit Lapatinib behandelt werden können, bleibt abzuwarten.⁴⁷

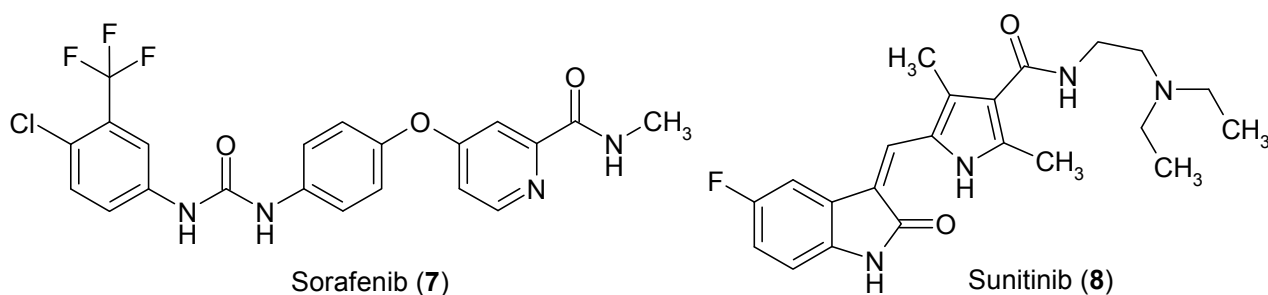


Abbildung 2-7: Multiproteinkinase-Inhibitoren

Für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom (RCC) steht seit 2006 in den USA und Europa der Multikinase-Inhibitor Sorafenib (7) (Nexavar[®], Bayer Schering Pharma AG) zur Verfügung. Er richtet sich gegen die Kinasen VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , FLT3, c-KIT sowie c-RAF und b-RAF, von denen einige in angiogene Prozesse involviert sind. Die Zulassung erfolgte aufgrund einer deutlichen Verbesserung des progressionsfreien Überlebens sowie einer geringeren Toxizität im Vergleich zur Standardtherapie.⁷⁰ 2007 erweiterte die FDA die Zulassung auf die Behandlung von nicht resezierbaren Leberzellkarzinomen.⁷¹

Auch Sunitinib (8) (Sutent[®], Pfizer) kann seit 2006 zur Behandlung von RCC eingesetzt werden. Die Zulassung erfolgte im Rahmen eines beschleunigten Verfahrens, da die Ansprechraten von Sunitinib deutlich über der von Sorafenib lagen und ein klinischer Vorteil gegenüber Sorafenib vermutet wurde. Darüber hinaus erfolgte 2006 die reguläre Zulassung von Sunitinib für die Behandlung von Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), die nicht chirurgisch entfernt werden können oder metastasieren, wenn eine Behandlung mit Imatinib fehlgeschlagen ist oder nicht vertragen wird.⁷² Sunitinib ist ebenfalls ein Multikinase-Inhibitor und hemmt alle drei Formen des VEGFR, c-KIT, PDGFR- α und - β , FLT3 und RET und vermindert dadurch Wachstum und Ausbreitung der Krebszellen.⁷³

Lapatinib, Sorafenib und Sunitinib binden an eine inaktive Konformation der Kinasen.⁵² Sie gehören somit ebenfalls zu den allosterischen bzw. Typ II Inhibitoren.

3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand im Aufbau einer fokussierten Substanzbibliothek zur Auffindung neuer Hemmstoffe der c-MET Kinase, die als potentielle Tumortheraeutika von Interesse sind. Ausgangspunkt dieser Studien war das Ergebnis eines virtuellen Screenings, bei dem etwa 1 Mio. kommerziell verfügbare Strukturen mit Hilfe des Docking-Programms FlexX in die ATP-Bindetasche der c-MET Kinase eingepasst wurden. Das virtuelle Screening wurde vor Beginn dieser Arbeit von Dr. Thomas Lemcke (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) und Prof. Dr. Matthias Rarey (Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg) durchgeführt. Als dreidimensionales Modell der Zielstruktur diente die Röntgenkristallstruktur einer DFG-in/ α C-out-Konformation von c-MET (PDB-ID: 1r0p⁷⁴). Das virtuelle Screening erfolgte auf Basis der ZINC Datenbank.⁷⁵ Weitere Informationen hierzu sind in Kapitel 8.4 zu finden.

Die bei diesem Screening gefundenen Hits wurden in einem Enzymassay auf ihre tatsächliche inhibitorische Aktivität getestet. Dabei erwiesen sich die Verbindungen **9** und **10** als schwach potente, aber selektive Inhibitoren der c-MET Kinase mit IC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich.

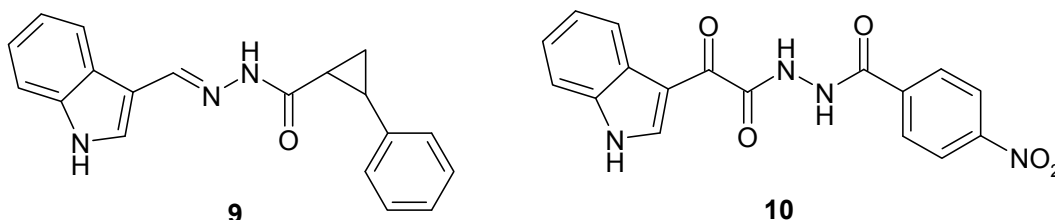


Abbildung 3-1: Auf Basis eines virtuellen Screenings identifizierte c-MET Kinase-Inhibitoren

Gewisse Strukturelemente der Ausgangsverbindungen sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben. Sie finden sich in Verbindungen wieder, die mitunter vielversprechende biologische Aktivitäten gegenüber verschiedenen Zielstrukturen zeigen (**11-14**). Die potentiellen Indikationsgebiete sind dabei sehr vielfältig und umfassen z. B. Tumorerkrankungen⁷⁶ (**11**), HIV-Infektionen^{77,78} (**12**), Prionenkrankheiten⁷⁹ (**13**) oder Schlafstörungen⁸⁰ (**14**). Bei den Verbindungen handelt es sich neben im Labor

entwickelten, rein synthetischen Strukturen auch um Naturstoffe. Zu Letzteren zählen die Coscinamide A und B (**11**), die aus Meeresschwämmen isoliert werden konnten.⁷⁶

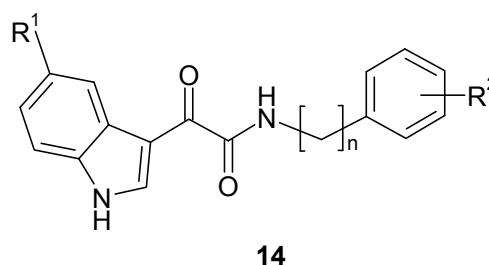
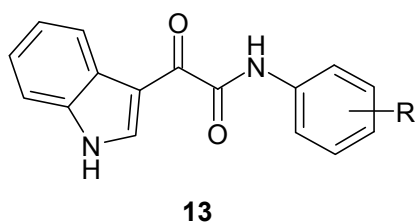
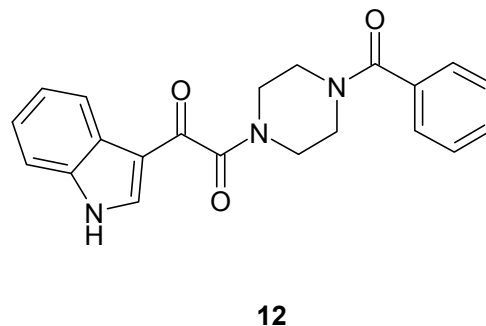
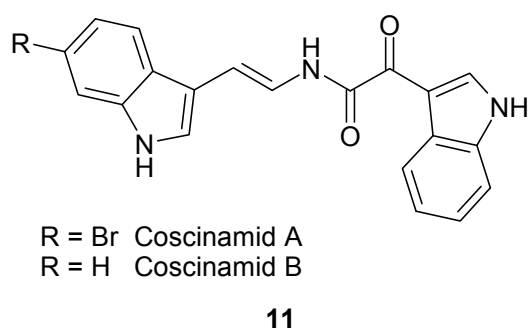


Abbildung 3-2: Literaturbekannte Analoga der Grundstrukturen **9** und **10**

Im Verlauf dieser Arbeit sollten Derivate und Analoga zu den Verbindungen **9** und **10** synthetisiert und bei Kooperationspartnern auf ihre inhibitorische Aktivität getestet werden. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Enzym- und Zellassays sollten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet und darauf basierend weitere neue Strukturen im Rahmen eines Optimierungsprogramms entwickelt werden. Generell wurde angestrebt, möglichst schnelle und kostengünstige Syntheseverfahren anzuwenden bzw. zu entwickeln, um auf diese Weise neue potentielle Hemmstoffe einfach zugänglich zu machen. Darüber hinaus sollten Docking-Experimente durchgeführt werden, um erste Anhaltspunkte über einen möglichen Bindemodus der Substanzen innerhalb der ATP-Bindetasche zu erhalten.

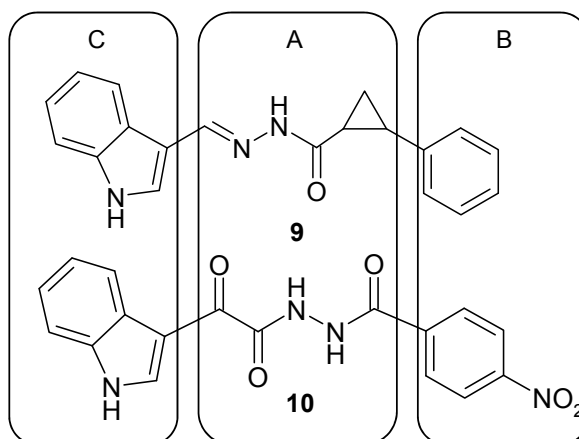


Abbildung 3-3: Schematische Einteilung der zu modifizierenden Strukturelemente A-C

Zunächst erfolgte eine Untersuchung der zentralen Strukturelemente A durch Einbau diverser Motive unterschiedlicher Kettenlängen. Die Modifikationen erfolgten dabei in den Verbindungen **15**, **16** und **17** basierend auf Grundstruktur **10**, während die Verbindungen **18** und **19** von Grundstruktur **9** abgeleitet wurden. Die biologische Testung der Verbindungen **15** bis **19** führte zur Ableitung eines hypothetischen Pharmakophors **20**. Auf dessen Basis sollte im nächsten Schritt eine Arretierung bzw. Cyclisierung dieser Elemente mit dem Ziel erfolgen, die konformative Beweglichkeit im Molekül einzuschränken. Die Verbindungen **21**, **22**, **23** und **24** enthalten das hypothetische Pharmakophor in unterschiedlichen cyclischen Anordnungen. In den Strukturen **25** und **26** ist dieses Pharmakophor nicht enthalten. Hierbei handelt es sich um cyclische Carbonsäurehydrazide, die im Gegensatz zum ursprünglichen Pharmakophor zwar lediglich eine Carbonylgruppe, aber durch eine weitere NH-Funktion einen zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Donor aufweisen. Abbildung 3-4 gibt einen Überblick über die Ableitung und Modifikation des Pharmakophors **20**.

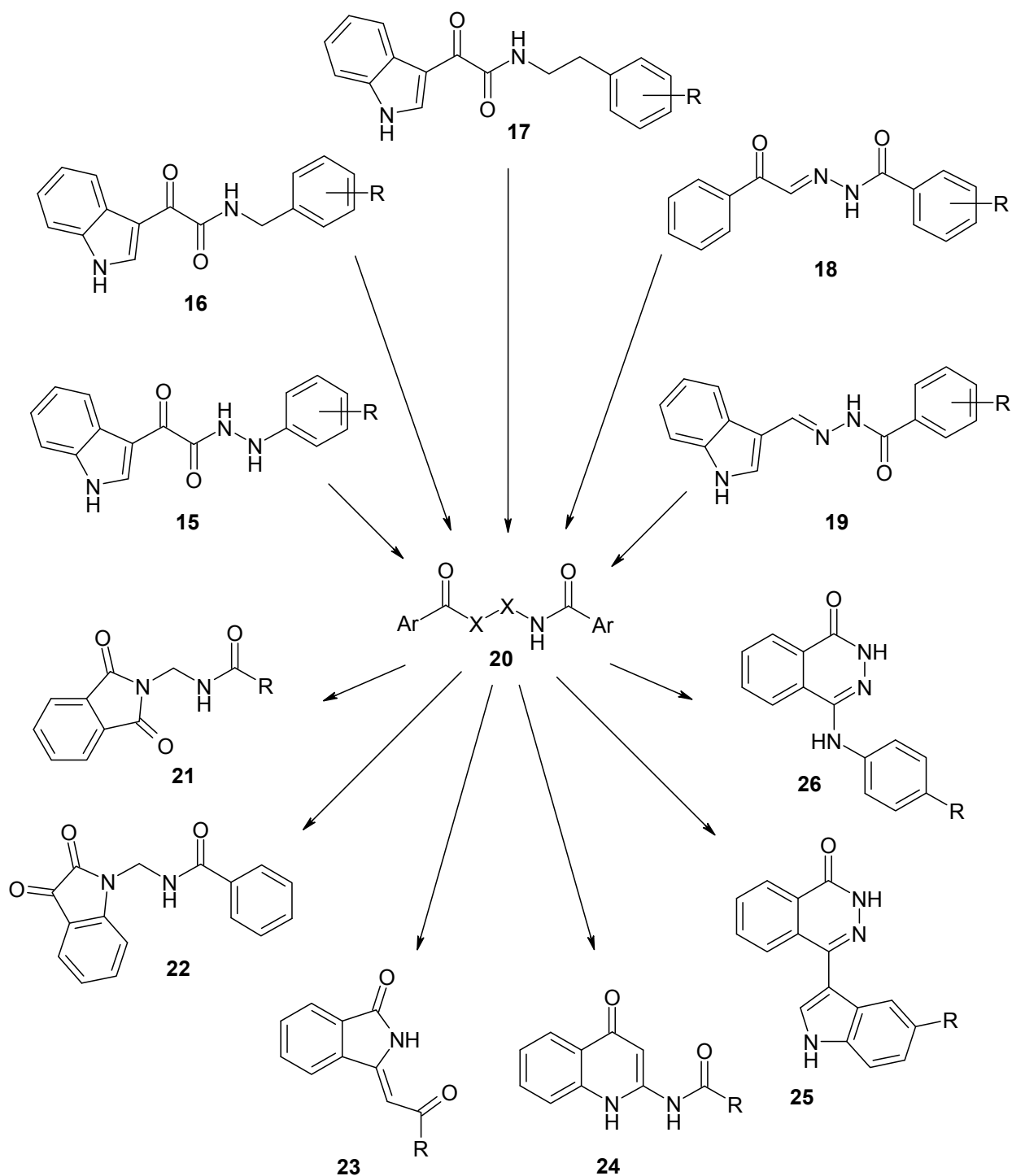


Abbildung 3-4: Ableitung und Variation des Pharmakophors 20

(X = C, N)

Auf Basis der Ergebnisse der biologischen Testung der in Abbildung 3-4 aufgeführten Verbindungen und unterstützt durch begleitende Docking Experimente sollten in einem nächsten Modifizierungsschritt unter Beibehaltung des ursprünglichen *N'*-Aroyl-2-oxo-

acetohydrazid-Strukturelements der Verbindung **10** die aromatischen Strukturen B und C variiert werden (Abbildung 3-5). Bei den Verbindungen **27** sollte der Phenylring (B) in verschiedenen Positionen mit diversen Substituenten unterschiedlicher Komplexität versehen werden. Bei den Verbindungen **28** wurden auf Seiten des Indols (C) Substitutionen in Position 5 angestrebt. In beiden Fällen lag ein Schwerpunkt auf der Synthese von Strukturen mit Biphenyl-Bausteinen.

Schließlich sollten basierend auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Verbindungen **27** und **28** Substitutionen mit aromatischen Resten sowohl am Phenylring (B) als auch am Indol (C) erfolgen (Verbindungen **29**).

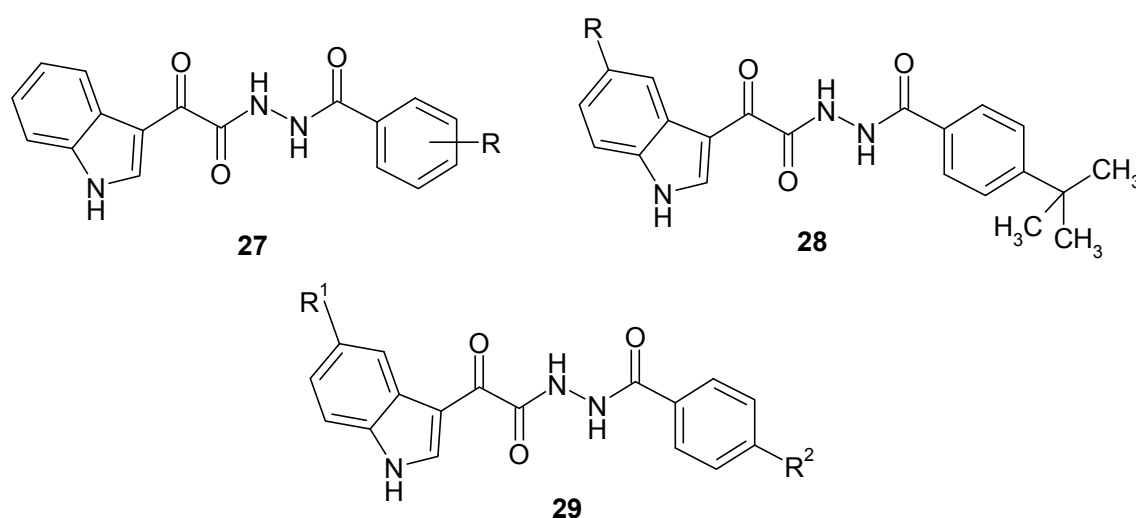


Abbildung 3-5: Durch Modifikation von Grundstruktur **10** darzustellende Verbindungen

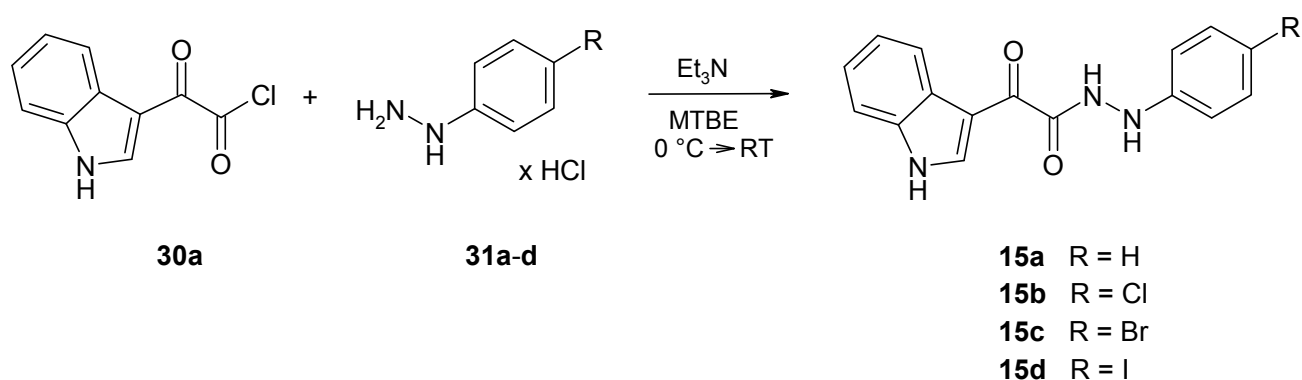
Die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen wurde zunächst jeweils in einem 8 bzw. 16 Kinasen umfassenden Enzymassay getestet. Dabei zeigte sich im Verlauf des Struktur-Optimierungsprogramms überraschenderweise eine interessante inhibitorische Aktivität gegenüber den Kinasen VEGFR-2, IGF-1R, TRK-B und SRC. Die bedeutende Rolle dieser Kinasen im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wurde bereits im Rahmen der Einleitung verdeutlicht. Aufgrund ihrer biochemischen Konnektivität ist daher eine gleichzeitige Hemmung ein überaus interessanter und vielversprechender Ansatz für potentielle Tumortheraeutika. Dies führte dazu, dass sich der Schwerpunkt dieser Arbeit von der Entwicklung selektiver c-MET Kinase-Inhibitoren zur Entwicklung selektiver Multiproteinkinase-Inhibitoren verlagerte.

4 Synthesen

4.1 Synthese der *N'*-Aryl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **15**

Bei den zum Teil in der Literatur beschriebenen Verbindungen **15** handelt es sich um von Grundstruktur **10** abgeleitete Strukturen, die sich durch ein um eine Carbonylgruppe reduziertes zentrales Strukturelement auszeichnen.

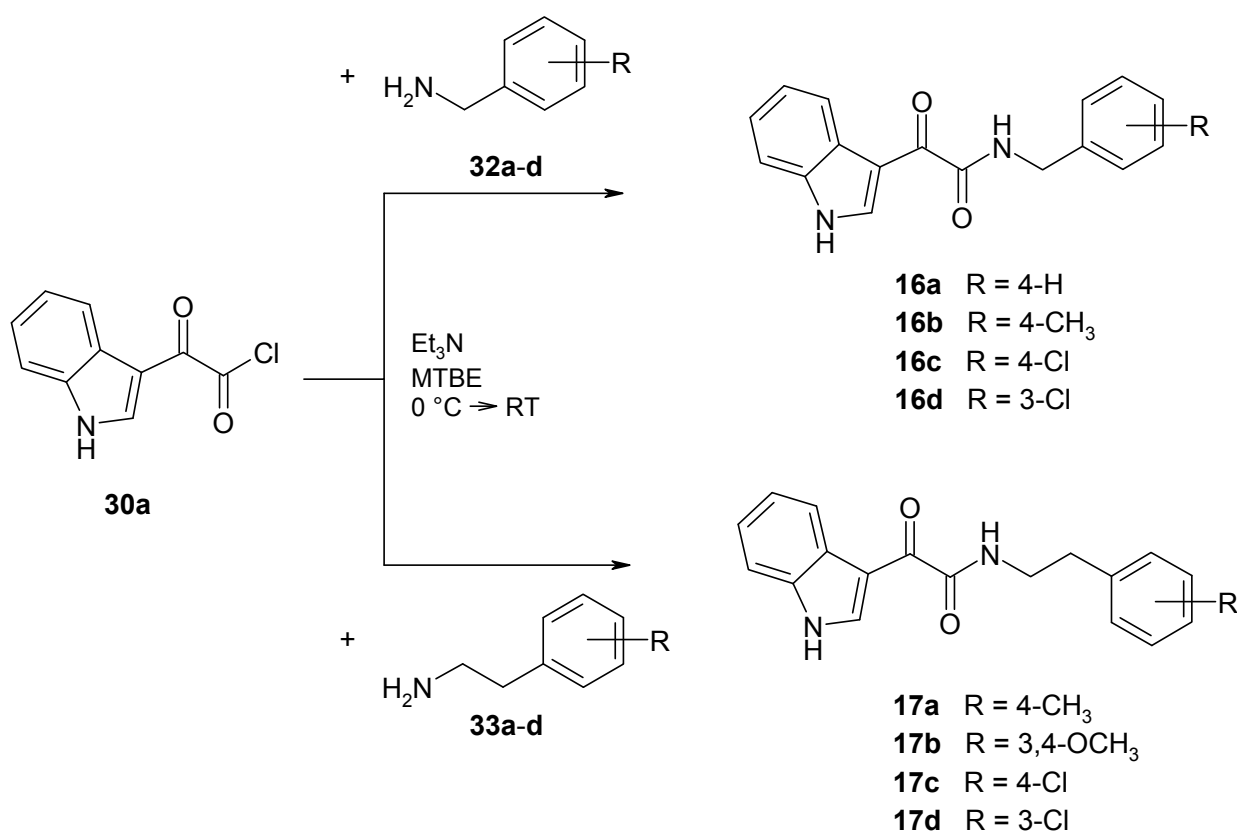
In Anlehnung an eine Vorschrift von DaSettimo und Mitarbeitern⁸¹ erfolgte die Synthese durch Umsetzung entsprechend substituierter Phenylhydrazine bzw. Phenylhydrazin-Hydrochloride **31** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**) in Anwesenheit von Triethylamin in *tert*-Butylmethylether (MTBE) (Schema 4-1). Da bei den in der Vorschrift angegebenen Reaktionszeiten von 4-36 h keine vollständige Umsetzung der Edukte, dafür aber eine verstärkte Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden konnte, wurden die Reaktionen nach 90 min abgebrochen.



Schema 4-1: Synthese der *N'*-Aryl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **15a-d**

4.2 Synthese der *N*-Arylalkyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide **16** und **17**

Die zum Teil literaturbekannten *N*-Arylalkyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide **16** und **17**, die von Grundstruktur **10** durch Austausch von Stickstoff- bzw. sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen gegen sp^3 -hybridisierte Kohlenstoffatome abgeleitet sind, wurden in einer zu den Verbindungen **15** analogen Weise hergestellt. Bei der Reaktion der Phenylalkylamine **32** bzw. **33** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**) unter den in Schema 4-2 angegebenen Bedingungen kam es im Unterschied zur Synthese der Verbindungen **15** schon nach 30 min zu einer vollständigen Umsetzung zu den gewünschten Endprodukten.

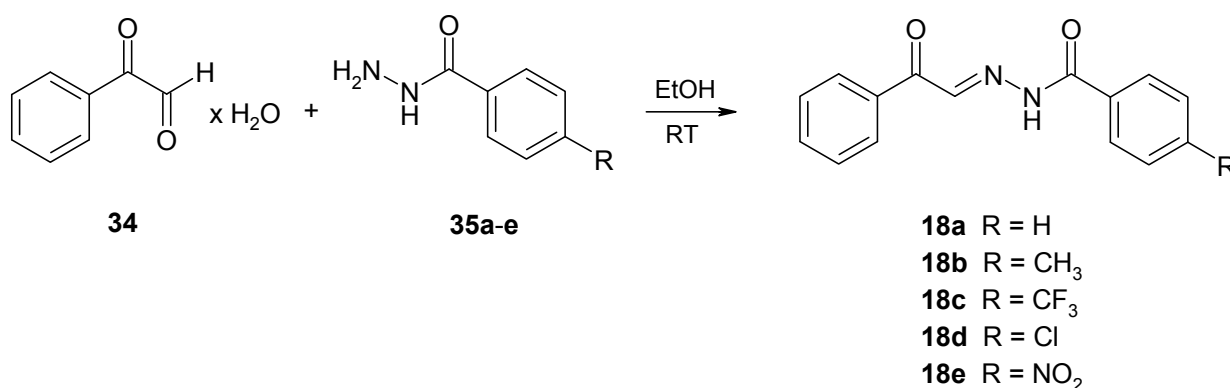


Schema 4-2: Synthese der *N*-Arylalkyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide **16a-d** und **17a-d**

Weitere Versuche, bei denen ein Austausch des bei der Synthese verwendeten Löse-
mittels MTBE gegen getrocknetes Toluol nach den Vorschriften von Kumar⁸² bzw.
Primofiore⁸³ erfolgte, führten zu geringeren Ausbeuten.

4.3 Synthese der *N'*-(2-Oxo-2-phenylethyliden)benzhydrazide **18**

Nach einer Vorschrift von Rodios und Alexandrou⁸⁴ konnten mehrere leicht zugängliche
Derivate dieser an Verbindung **9** angelehnten Strukturklasse synthetisiert werden.
Mehrstündiges Rühren einer Mischung aus Phenylglyoxal-Monohydrat (**34**) und dem
entsprechenden Benzhydrazid **35** in Ethanol bei Raumtemperatur führte direkt zur Aus-
fällung der Produkte **18a-e** (Schema 4-3).



Schema 4-3: Synthese der *N'*-(2-Oxo-2-phenylethyliden)benzhydrazide **18a-e**

Ein typisches Merkmal dieser Verbindungsklasse ist das Auftreten sehr breiter Signale
in den NMR-Spektren, die eine genaue Charakterisierung des Aufspaltungsmusters
erschweren. Dies könnte auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Tautomeren
bzw. E/Z-Isomeren zurückzuführen sein. Ein möglicher Übergang zwischen E- und Z-
Isomer ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Das aus dem E-Isomer hervorgehende Enol-
Konformer A kann durch Rotation um eine Einfachbindung in das Enol-Konformer B
übergehen. Durch die sich in dieser Struktur ausbildende intramolekulare Wasserstoff-
brücke wird ein intramolekularer Protonentransfer begünstigt, aus dem wiederum das

Z-Isomer hervorgehen kann. Weiterführende Untersuchungen zum möglichen Vorliegen dieses Gleichgewichts wurden nicht vorgenommen.

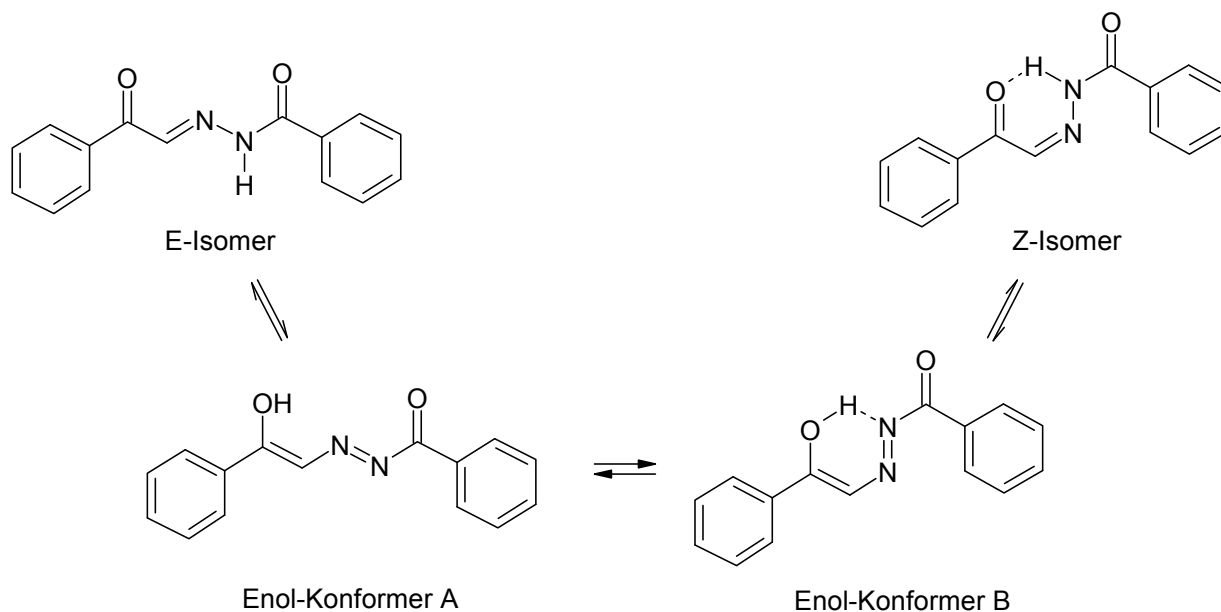
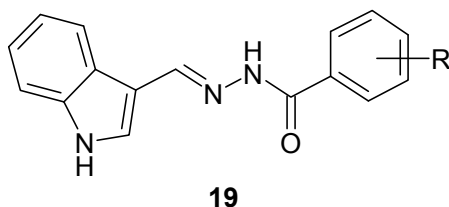


Abbildung 4-1: Postulierte Tautomere und E/Z-Isomere der Verbindungsklasse **18**

4.4 *N'*-(1*H*-Indol-3-ylmethyliden)benzhydrazide **19**

Von diesen an Grundstruktur **9** angelehnten Verbindungen sind sehr viele Derivate in der Literatur beschrieben bzw. in Datenbanken hinterlegt und kommerziell verfügbar. Aus diesem Grund wurde von einer Synthese abgesehen und stattdessen die in Tabelle 4-1 aufgeführten Strukturen zu Testzwecken von der Firma Ambinter erworben.

Tabelle 4-1: *N'*-(1*H*-Indol-3-ylmethyliden)benzhydrazide **19**^a

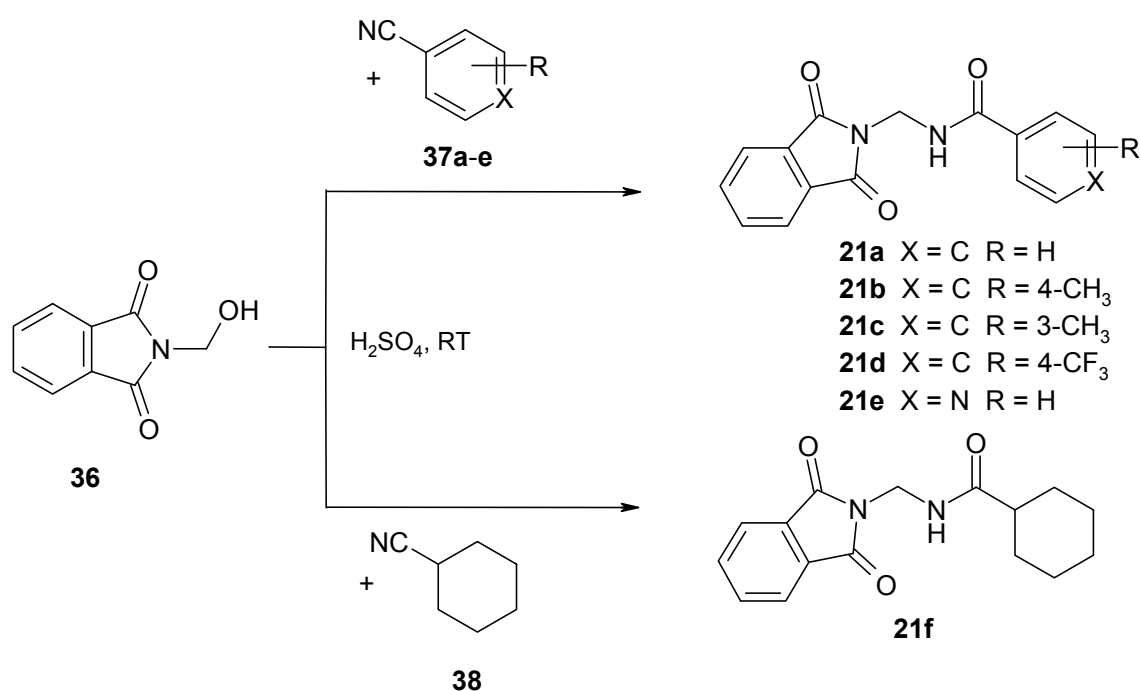


19	R	Substanzcode	19	R	Substanzcode
a	4-H	AKI-STT-00081611	i	4-NH ₂	A0608/0028152
b	2-CH ₃	A1666/0071032	j	3-NO ₂	AKI-STT-00193675
c	4-CH ₃	T5359094	k	4-NO ₂	AKI-STT-00193673
d	4-C(CH ₃) ₃	STK164182	l	2-Cl	STK063394
e	4-C ₆ H ₅	STK018260	m	3-Cl	AKI-STT-00193672
f	4-OCH ₃	AKI-STT-00214557	n	4-Cl	STK064781
g	3,5-OCH ₃	T5359152	o	4-Br	AKI-STT-00260429
h	3,4-OH	STOCK1S-39114			

^a bezogen von der Firma Ambinter (Paris, Frankreich)

4.5 Synthese der *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]benzamide **21**

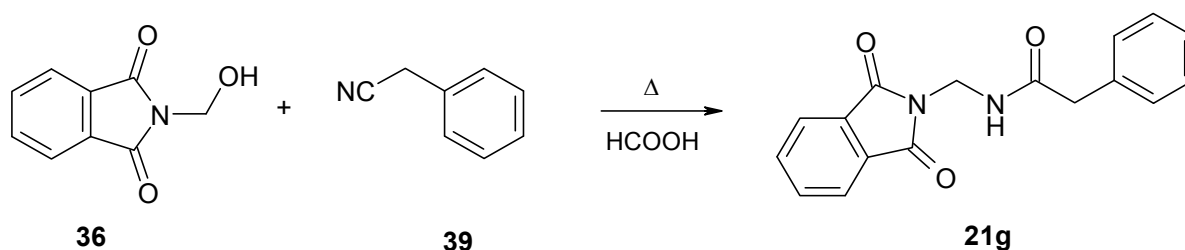
Die Verbindungen **21** sowie die in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführten Verbindungen **22** bis **24** stellen cyclische Derivate des hypothetischen Pharmakophors **20** dar. Die Synthese der Verbindungen **21a-f** erfolgte nach einer Vorschrift von Buc⁸⁵, nach der äquimolare Mengen *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (**36**) mit den Nitrilen **37** bzw. **38** in konzentrierter Schwefelsäure für einige Stunden gerührt wurden (Schema 4-4).



Schema 4-4: Synthese der *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]benzamide **21a-f**

4.5.1 Synthese von *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]-2-phenylacetamid (**21g**)

Die Synthese dieser Verbindung gelang nicht unter den im vorherigen Kapitel beschriebenen Reaktionsbedingungen, sie konnte aber nach einer Vorschrift von Gullickson und Lewis⁸⁶ durch Refluxieren von Phenylacetonitril (**39**) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (**36**) in Ameisensäure durchgeführt werden (Schema 4-5).



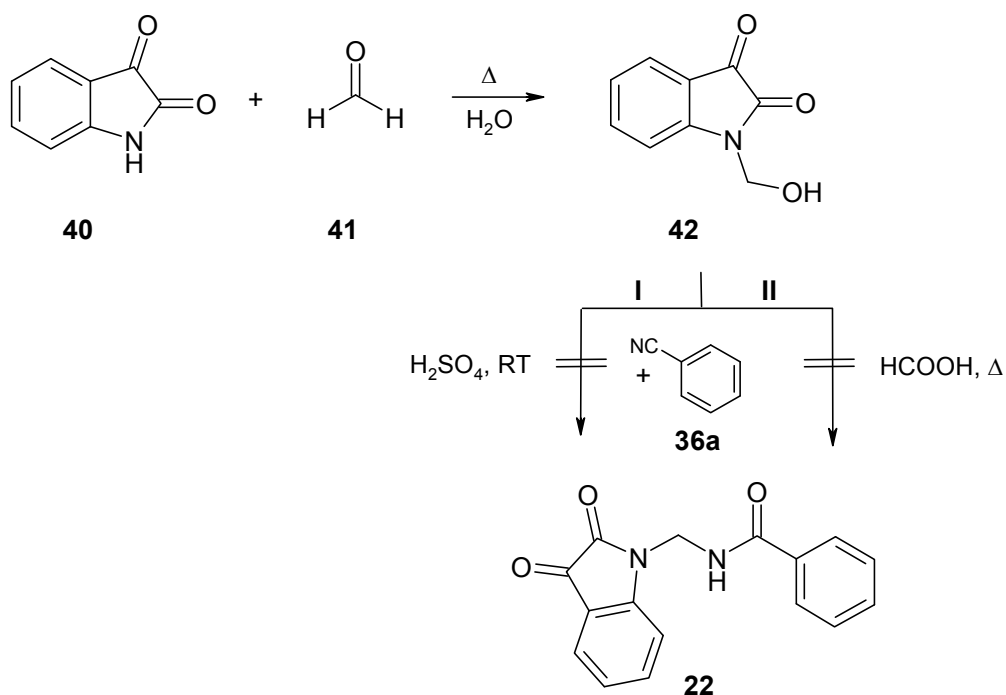
Schema 4-5: Synthese von *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]-2-phenylacetamid **21g**

4.6 Synthese von *N*-[(2,3-Dioxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)methyl]benzamid (**22**)

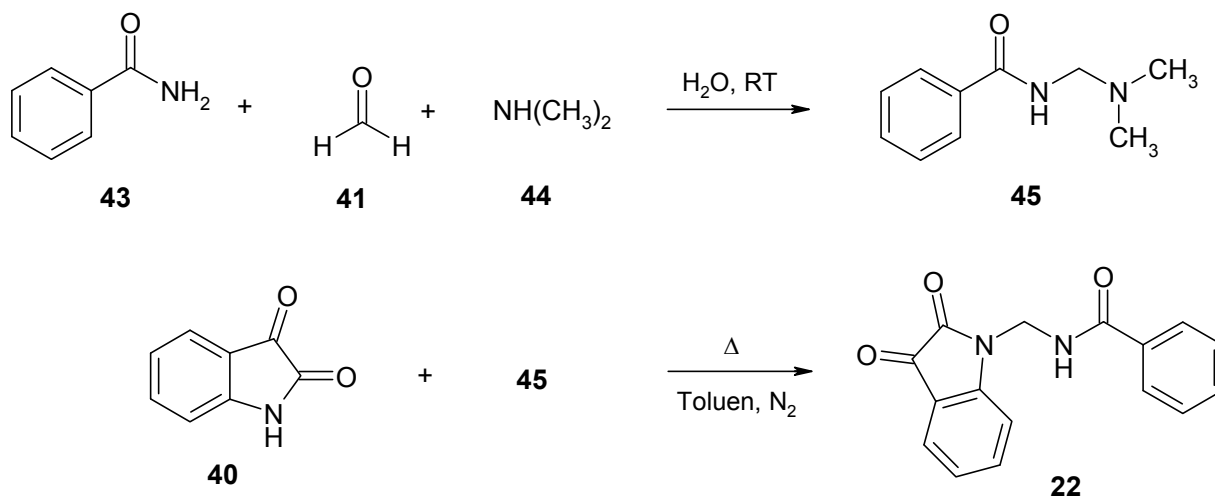
Zunächst wurde versucht, auch diese Verbindung nach der Vorschrift von Buc⁸⁵ herzustellen. Das dafür benötigte 1-(Hydroxymethyl)-1*H*-indol-2,3-dion (**42**) wurde ausgehend von 1*H*-Indol-2,3-dion (**40**) mit Formaldehyd (**41**) hergestellt. Die anschließende Umsetzung von **42** mit Benzonitril (**36a**) in konzentrierter Schwefelsäure führte jedoch zur Bildung eines Produktgemisches, aus dem die gewünschte Verbindung **22** nicht isoliert werden konnte (Schema 4-6-I).

Auch die Umsetzung in Ameisensäure unter Rückflusserhitzen nach der Vorschrift von Gullickson und Lewis⁸⁶ blieb erfolglos (Schema 4-6-II).

Die Synthese gelang schließlich nach einer Vorschrift von Hellmann und Haas⁸⁷. Zunächst erfolgte die Darstellung von *N*-[(Dimethylamino)methyl]benzamid (**45**) aus Benzamid (**43**), Formaldehyd (**41**) und Dimethylamin (**44**). **45** konnte im Anschluss mit 1*H*-Indol-2,3-dion (**40**) in siedendem Toluol zum gewünschten Produkt **22** umgesetzt werden (Schema 4-7).



Schema 4-6: Versuch der Synthese von *N*-[(2,3-Dioxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)methyl]benzamid (**22**) nach Buc⁸⁵ und Gullickson⁸⁶

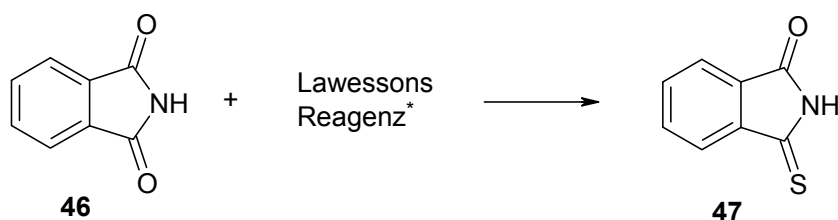


Schema 4-7: Synthese von *N*-[(2,3-Dioxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)methyl]benzamid (**22**) nach Hellmann und Haas⁸⁷

4.7 Synthese der Isoindol-Derivate 23

4.7.1 Thiocarbonylierung mit Lawessons Reagenz

Als Edukt für die Synthese der Verbindungen **23a** und **23b** wurde Monothiophthalimid (**47**) benötigt. Dieses wurde durch die Umsetzung von Phthalimid (**46**) mit Lawessons Reagenz (**48**) dargestellt (Schema 4-8).

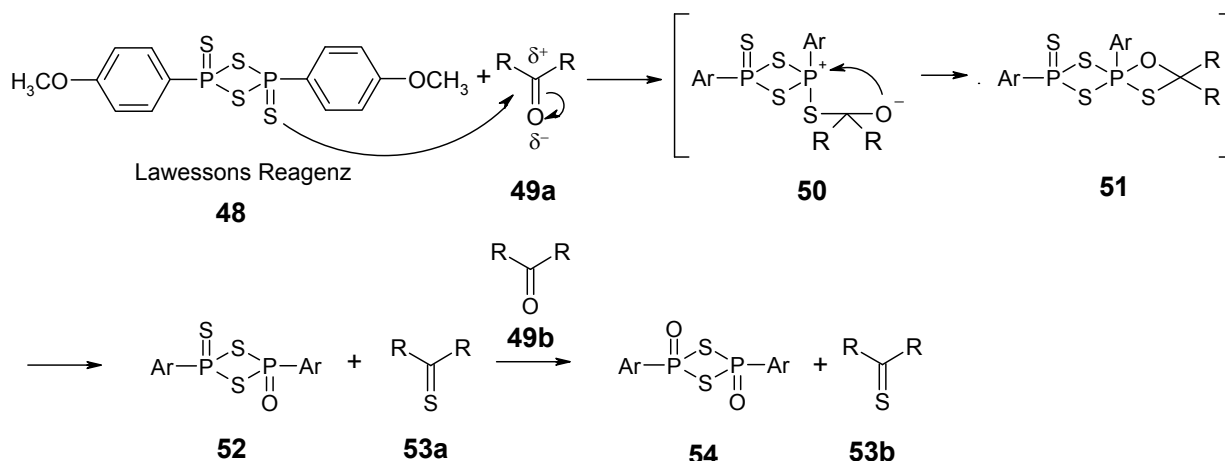


Schema 4-8: Mono-Thiocarbonylierung von Phthalimid (**46**)

(* Struktur von Lawessons Reagenz siehe Schema 4-9)

Es handelt sich bei Lawessons Reagenz um 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan-2,4-disulfid, das im Rahmen einer Thiocarbonylierung nach dem in Schema 4-9 gezeigten Reaktionsmechanismus insgesamt zwei Sauerstoff- gegen Schwefelatome austauschen kann. Der Mechanismus ist mit dem einer Wittig-Reaktion vergleichbar. Zunächst erfolgt ein Angriff an das positiviert Kohlenstoffatom der Carbonyl-Verbindung **49a** unter Ausbildung der Zwitterion-Struktur **50**, welche intramolekular zum Oxathiaphosphetan **51** weiterreagiert. Aus dieser Zwischenstufe wird im Anschluss die gewünschte Thiocarbonyl-Verbindung **53a** freigesetzt. Auf gleiche Weise kann der Austausch mit dem in Struktur **52** verbleibenden Schwefel und einer weiteren Carbonyl-Verbindung **49b** erfolgen.

Die Umsetzung mit Lawessons Reagenz ist in der Literatur oft beschrieben. Sowohl Mono- als auch Dithiocarbonylierungen konnten unproblematisch durchgeführt werden. Lawessons Reagenz ist reaktiver als Phosphor(V)-sulfid und zudem bei höheren Temperaturen ausreichend in organischen Lösungsmitteln löslich, so dass Reaktionen in homogenen Lösungen durchgeführt werden können.⁸⁸⁻⁹³



Schema 4-9: Postulierter Reaktionsmechanismus der Thiocarbonylierung mit Lawessons Reagenz nach Eychenne und Mouloungui⁸⁹

Da in diesem Fall nur einfach substituiert werden sollte, erfolgte die Umsetzung von Phthalimid (**46**) mit Lawessons Reagenz (**48**) im Verhältnis 2:1. Die Synthese wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt, mit dem Ziel, möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen.

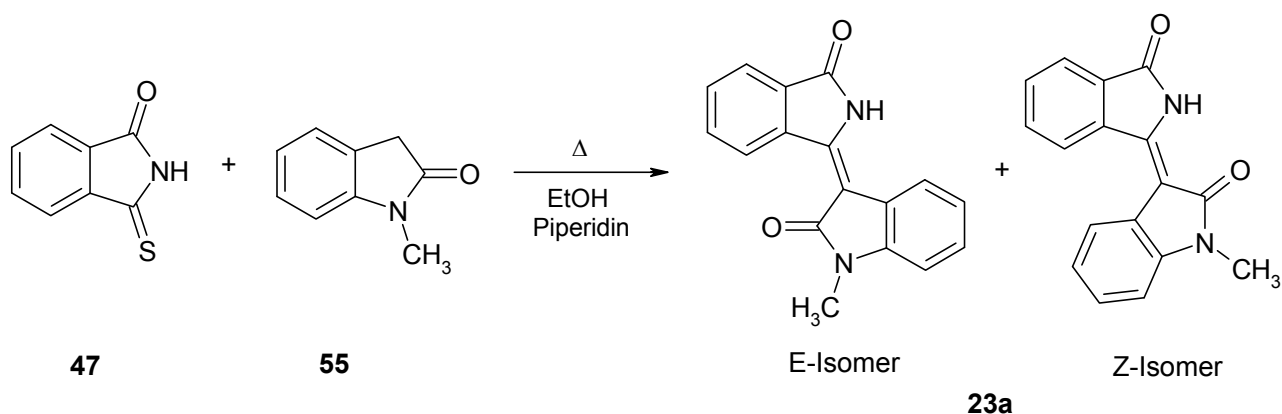
Nach einer Vorschrift von Yde et al.⁹² wurde Phthalimid (**46**) in getrocknetem THF mit Lawessons Reagenz (**48**) bei 60 °C gerührt, wobei gelegentlich THF ergänzt werden musste. Es entstanden zwei Produkte, die sich durch Säulenchromatographie unter Verwendung von Petrolether/Ethylacetat 2:1 trennen ließen. Die Identifizierung des gewünschten Produktes **47** erfolgte über eine Schmelzpunktbestimmung. Die Ausbeute war mit 8%, verglichen mit der in der Literatur angegebenen Ausbeute von 22%⁹², sehr gering.

Ein weiterer Syntheseversuch in getrocknetem, siedendem THF führte nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute. Hier fand keine Umsetzung statt.

Auch die Umsetzung in Toluol bei 80 °C nach Scheibye et al.⁹¹ blieb erfolglos. Erst in siedendem Toluol und anschließender säulenchromatographischer Trennung des Produktgemisches mit Petrolether/Ethylacetat 2:1 gelang die Isolierung des gewünschten Monothiophthalimids (**47**) in einer Ausbeute von 35%.

4.7.2 Synthese von 1-Methyl-3-(3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-1-yliden)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on (**23a**)

Die literaturbekannte Verbindung **23a** wurde basierend auf einer Vorschrift von Porter et al.⁹⁴ hergestellt. Monothiophthalimid (**47**) wurde mit einer äquimolaren Menge *N*-Methyl-2-oxindol (**55**) unter Zusatz von Piperidin in Ethanol zum Rückfluss erhitzt (Schema 4-10).

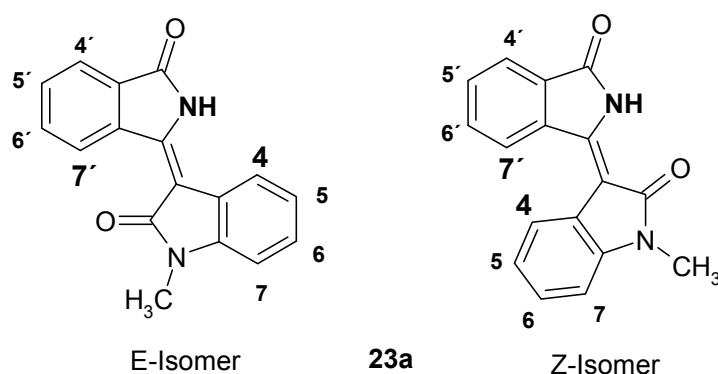


Schema 4-10: Darstellung von 1-Methyl-3-(3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-1-yliden)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on (**23a**)

Bei der isolierten Substanz handelte es sich um ein Gemisch des E- und des Z-Isomers im Verhältnis 5:1, wie aus dem doppelten Signalsatz des ¹H-NMR-Spektrums geschlossen werden konnte. Ausschlaggebend für die Zuordnung der Signalsätze war die sich durch den Anisotropie-Effekt der Carbonylgruppe des Indol-2-ons ergebende Veränderung der chemischen Verschiebung bestimmter Protonen. Der Anisotropie-Effekt hat in Abhängigkeit des vorliegenden Isomers eine Tieffeld-Verschiebung des Protons H-7' bzw. des Isoindol-NHs zur Folge, da diese jeweils im Entschirmungsbereich liegen. Aufgrund der planaren Struktur des Moleküls entfaltet sich dieser Effekt hier in voller Stärke. Die vorgenommene Zuordnung konnte durch einen Vergleich mit vorhergesagten Werten bestätigt werden (Tabelle 4-2). Auch im ¹³C-Spektrum war ein doppelter Signalsatz vorhanden. Die Hochleistungsflüssigchromatogramme zeigten ebenfalls das Vorliegen beider Isomere an. Der Schmelzpunkt dieses Substanz-

gemisches lag um 10 °C über dem in der Literatur referierten Wert⁹⁴, der offensichtlich mit einer Probe mit einem anderen E/Z-Isomerenverhältnis gewonnen worden war.

Tabelle 4-2: Vergleich der chemischen Verschiebungen von E- und Z-Isomer im ¹H-NMR von **23a**

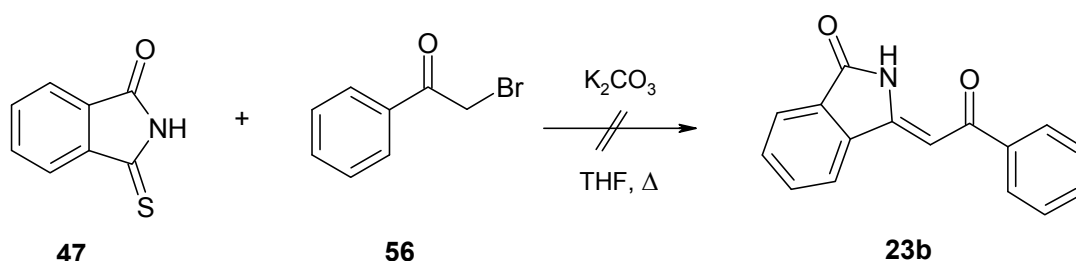


Chemische Verschiebung [ppm]				
¹ H-NMR von 23a			Vorhersage	
	Signalsatz 1 (5 Teile)	Signalsatz 2 (1 Teil)	E-Isomer	Z-Isomer
NH	10.70	11.43	8.83	9.82
4-H	7.73	7.91	7.17	7.41
5-H	7.03	7.13	7.07	7.08
6-H	7.31	7.37	7.15	7.15
7-H	7.07	7.18	7.11	7.10
4'-H	7.99	8.05	7.65	7.67
5'-H	7.81	7.78	7.23	7.25
6'-H	7.88	7.94	7.40	7.41
7'-H	9.58	8.51	7.65	7.50
CH ₃	3.25	3.27	3.28	3.27

Die für die Zuordnung von E- und Z-Isomer relevanten Protonen sind hervorgehoben. Die Vorhersage erfolgte mit MNOVA.⁹⁵

4.7.3 Synthese von 3-(2-Oxo-2-phenylethyliden)-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-1-on (23b)

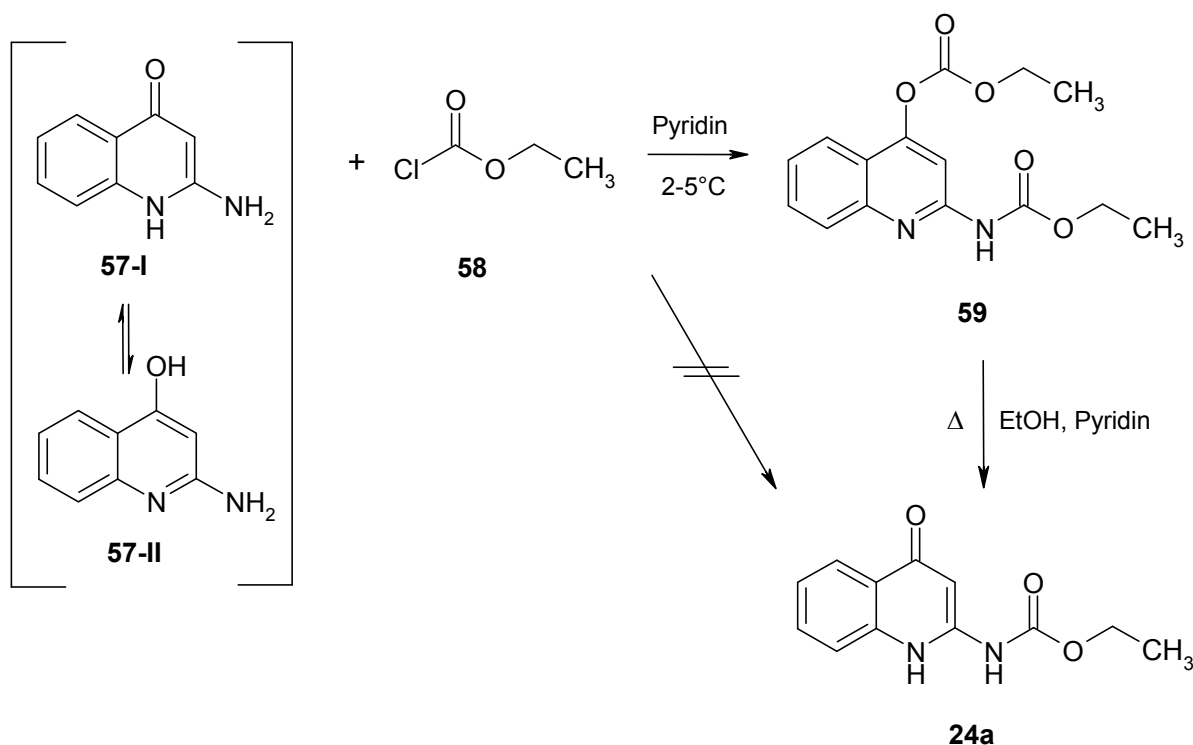
Zur Darstellung von **23b** wurde **47** nach einer Vorschrift von Zhu et al.⁹³ mit einer äquimolaren Menge 2-Bromacetophenon (**56**) in Anwesenheit von Kaliumcarbonat in THF zum Rückfluss erhitzt (Schema 4-11). Das nach entsprechender Aufarbeitung zurückbleibende Reaktionsgemisch wurde mittels Säulenchromatographie getrennt. Es konnte weder mit dem in der Literatur angegebenen Fließmittel Dichlormethan noch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch eine reine Fraktion gewonnen und somit kein gewünschtes Produkt isoliert werden.



Schema 4-11: Angestrebte Synthese von **23b** nach Zhu et al.⁹³

4.8 Synthese der *N*-(4-Oxo-1,4-dihydrochinolin-2-yl)amide **24**

Stýskala et al.⁹⁶ berichteten über die nicht erfolgreiche direkte Monoacylierung von 2-Amino-4(1*H*)-chinolinon (**57**) (Schema 4-12). Bei der Umsetzung mit Ethylchlorformiat (**58**) gelang ihnen ausschließlich die Isolierung des zweifach substituierten Produkts **59**. Sie wiesen mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie ein in Pyridin vorliegendes tautomeres Gleichgewicht zwischen 2-Amino-4(1*H*)-chinolinon (**57-I**) und 2-Amino-4-chinolinol (**57-II**) nach und begründeten die Zweifachacylierung durch die höhere Reaktivität der Hydroxyverbindung **57-II** an den beiden Reaktionszentren. So erhielten sie Verbindung **24a** erst nach einer sich der Acylierung anschließenden selektiven Hydrolyse des Kohlensäurediesters in Position 4, der wesentlich leichter hydrolysierbar ist als die Carbamatfunktion in Position 2.



Schema 4-12: Postulierter Ablauf der Synthese von Ethyl-4-oxo-1,4-dihydro-2-chinolylcarbamat **24a** nach Stýskala⁹⁶

Im Rahmen der hier durchgeführten Synthese führte die Umsetzung von 2-Amino-4(1*H*)-chinolinon (**57**) mit Ethylchlorformiat (**58**) in wasserfreiem Pyridin unter Eiskühlung zur Bildung eines Zwischenprodukts, bei dem es sich nicht um die postulierte zweifach substituierte Verbindung **59** handeln konnte. Der Signalsatz im ¹H-NMR-Spektrum des isolierten Produkts entspricht 12 Protonen (Abbildung 4-2). Dies stimmt mit der Summenformel C₁₂H₁₂N₂O₃ der einfach substituierten Verbindung **24a** überein. Es finden sich ein leicht Tieffeld-verschobenes Quartett bei 4.22 ppm und ein Triplett bei 1.18 ppm, welche 2 bzw. 3 Protonen entsprechen, und Kopplungskonstanten von 7.1 Hz bzw. 7.0 Hz aufweisen. Die chemische Verschiebung ist hierbei typisch für eine Ethylgruppe in Nachbarschaft zu elektronenziehenden Strukturelementen. In der von Stýskala postulierten zweifach substituierten Verbindung **59** müssten 2 solcher Ethylgruppen zu finden sein. Zudem treten bei 12.24 ppm sowie 7.96 ppm zwei breite Singuletts auf, die auf an Heteroatome gebundene Protonen hindeuten. Hier dürfte hingegen beim postulierten Zwischenprodukt **59** nur ein Signal erscheinen.

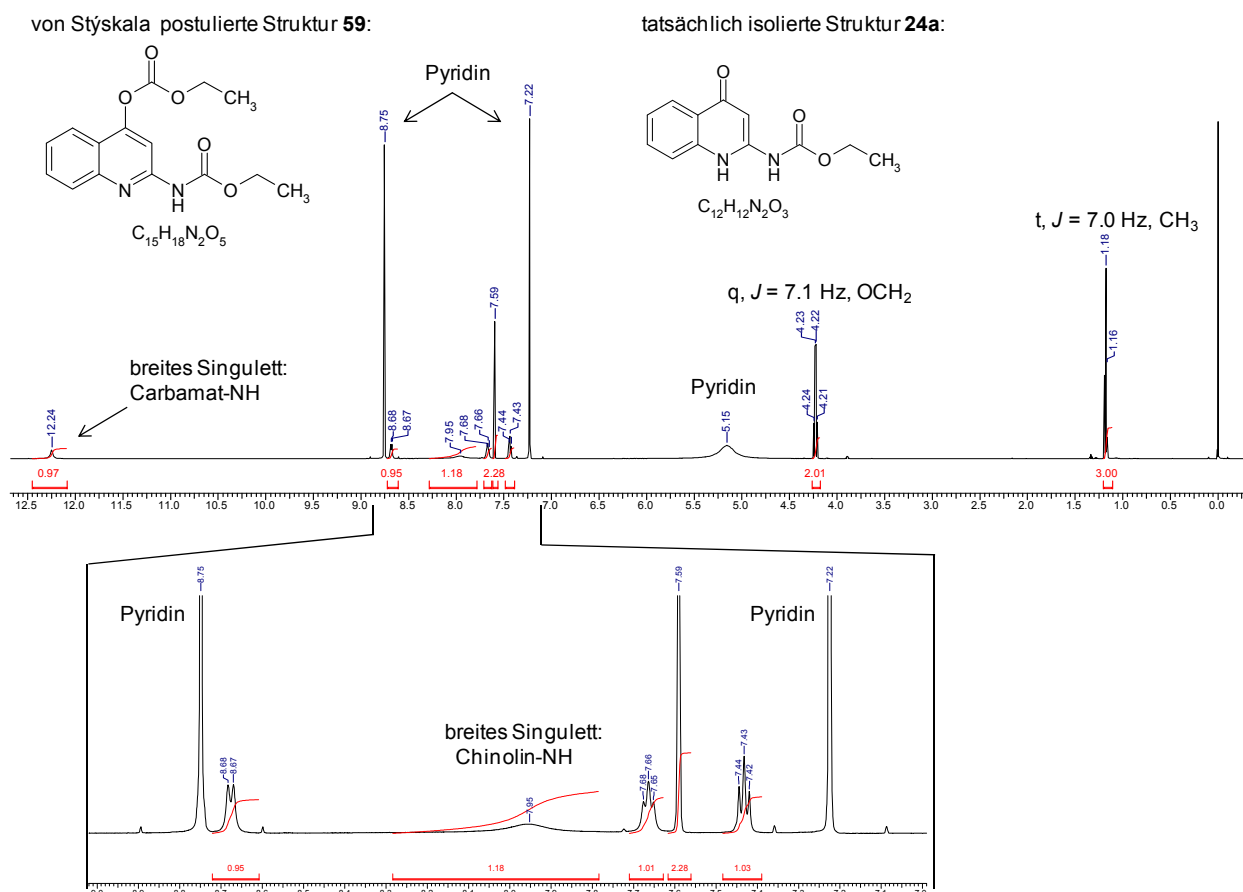


Abbildung 4-2: ^1H -NMR-Spektrum von **24a** im Lösungsmittel Pyridin- d_5

Lösungsmittelabhängig kommt es zudem zu einer Tautomerisierung der Verbindung. Bei Verwendung von DMSO- d_6 sind sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum doppelte Signalsätze im Verhältnis 2:1 zu erkennen. In Abbildung 4-3 ist das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **24a** in DMSO- d_6 dargestellt. Im tiefen Feld sind insgesamt 4 Singulets zu finden, die durch Zugabe von Deuteriumoxid gelöscht werden. Es handelt sich also um an Heteroatome gebundene Wasserstoffatome. Vermutlich kommt es zu einem tautomeren Gleichgewicht zwischen der Chinolinon- und der Chinolinol-Struktur **24a-I** bzw. **24a-II**. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit vorhergesagten Werten spricht dafür, dass **24a-I** den größeren Anteil ausmacht. Das Vorliegen solcher Tautomere konnte Stýskala schon bei der Ausgangsverbindung zeigen. Interessanterweise traten sie dort jedoch in Pyridin auf, was hier gerade nicht der Fall ist.

Die Ergebnisse der Elementaranalytik und der ermittelte Schmelzpunkt untermauern die Daten der NMR-Spektren und sind eine zusätzliche Bestätigung für das Vorliegen der einfach substituierten Struktur **24a**.

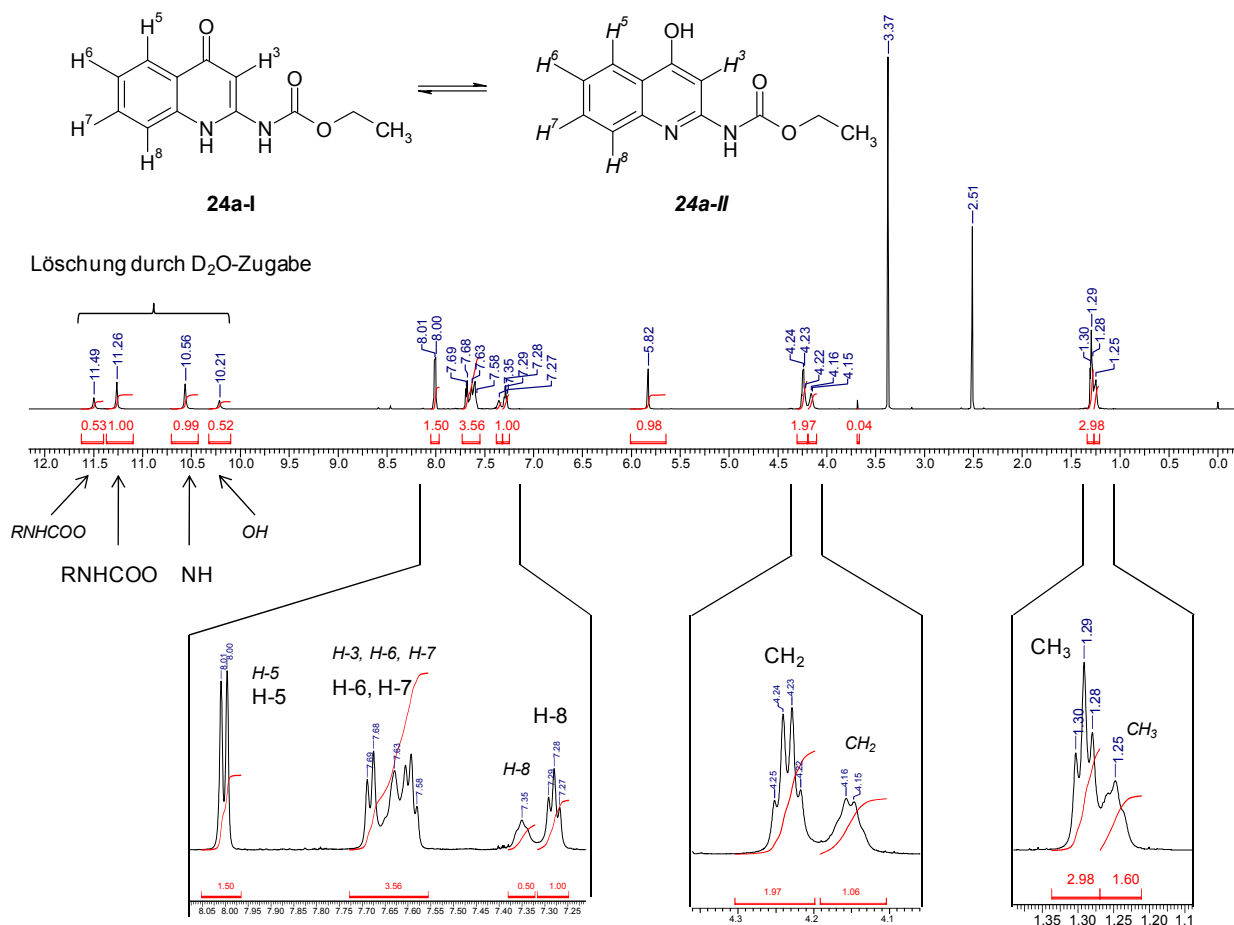
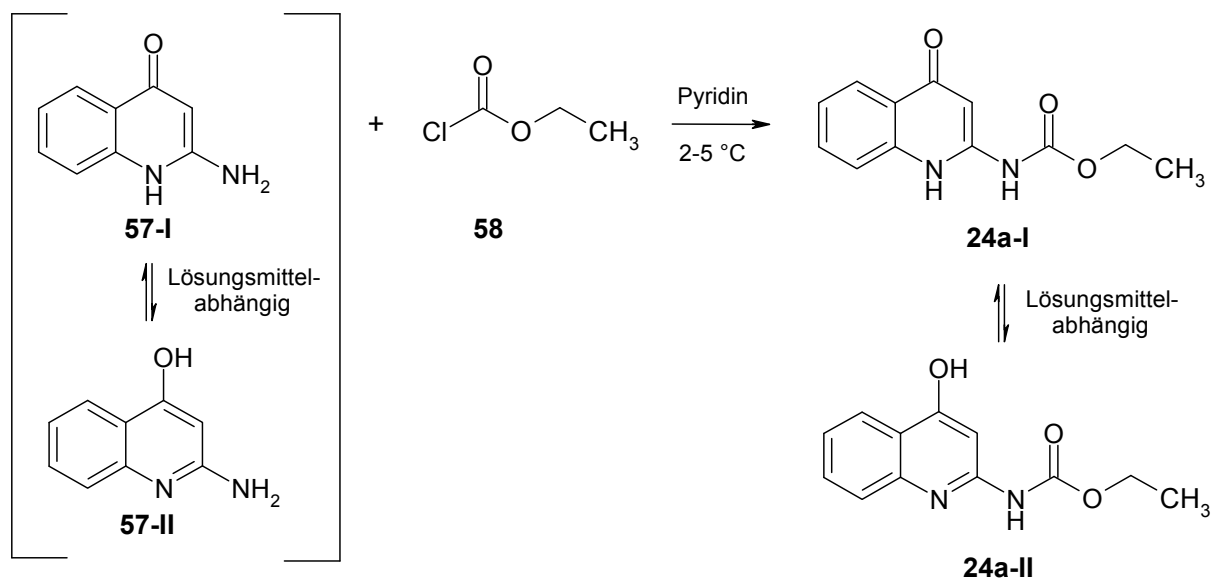


Abbildung 4-3: ¹H-NMR-Spektrum im Lösungsmittel DMSO-*d*₆ mit tautomeren Formen von **24a**

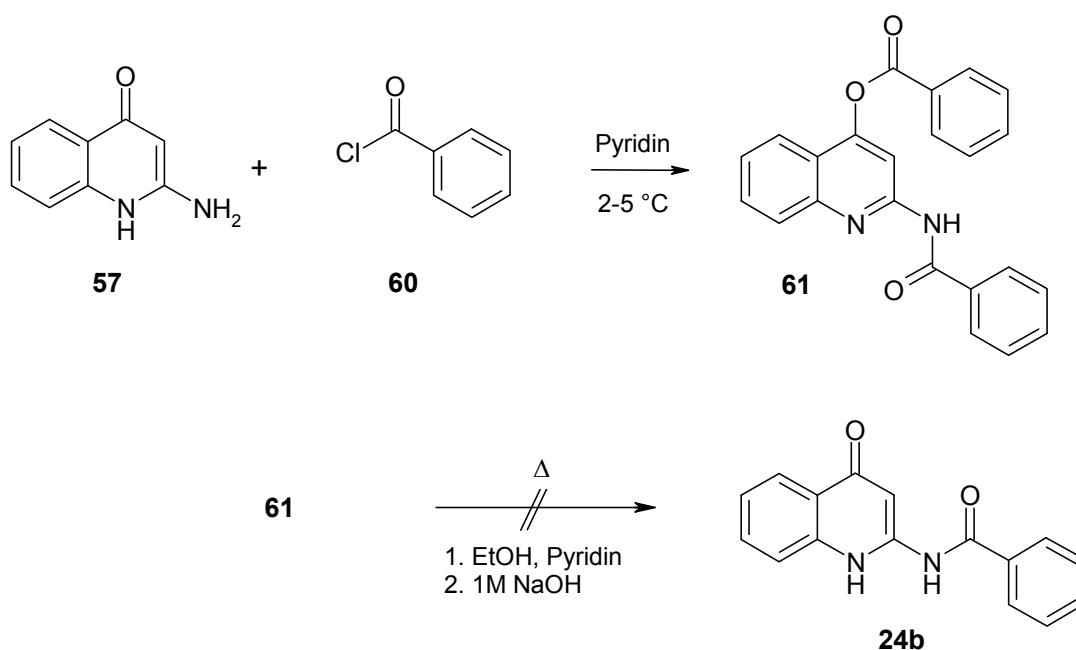
(Kursiv gedruckte Strukturelemente entsprechen **24a-II**. Die Zuordnung basiert auf einem Vergleich der chemischen Verschiebungen mit vorhergesagten Werten. Die Vorhersage erfolgte mit MNOVA.⁹⁵)

Unter den in Schema 4-13 angegebenen Reaktionsbedingungen war die Synthese reproduzierbar, so dass in diesem Fall eine neue, einstufige Methode zur Darstellung von **24a** etabliert werden konnte.



Schema 4-13: Einstufige Synthese von **24a**

Die Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die angestrebte Synthese von **24b** gelang nicht. Bei der Reaktion von **57** mit Benzoylchlorid (**60**) wurde ein zweifach acyliertes Produkt erhalten, das sich nicht zu der gewünschten monoacylierten Zielstruktur **24b** hydrolysieren ließ (Schema 4-14).

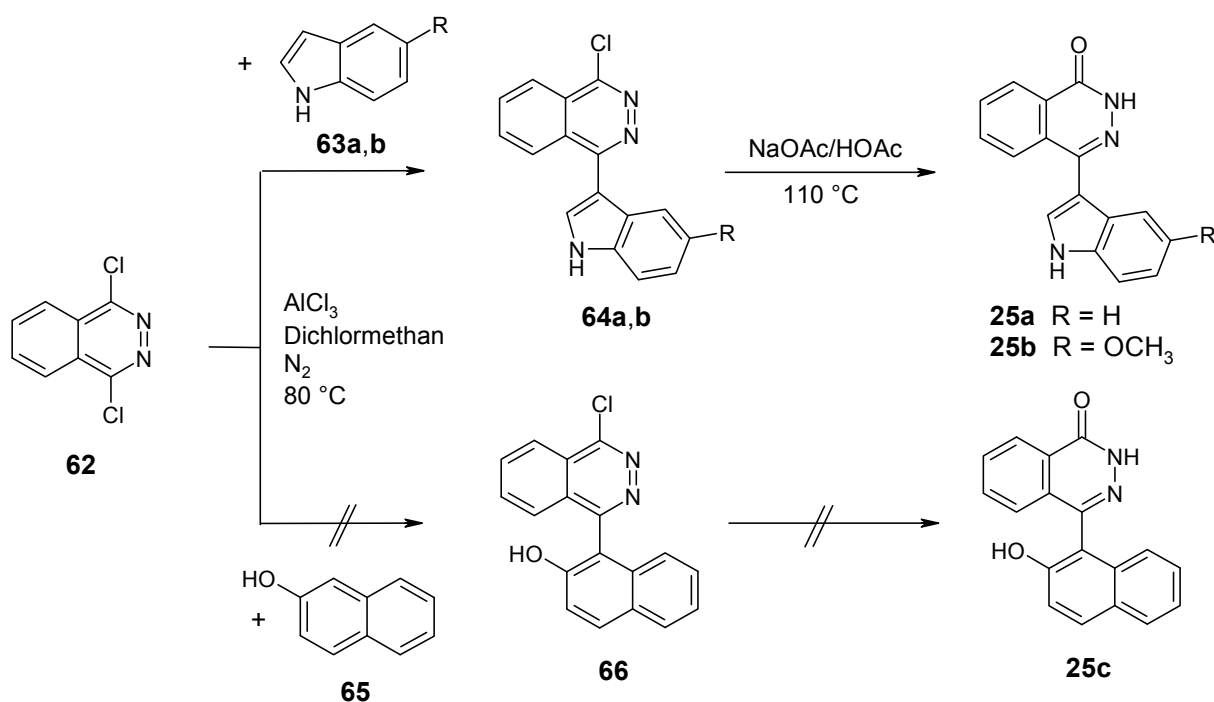


Schema 4-14: Syntheseversuch von *N*-(4-Oxo-1,4-dihydrochinolin-2-yl)benzamid (**24b**)

4.9 Synthese der 4-Aryl-1(2H)-phthalazinone **25**

Die Verbindungen **25** und **26** stellen weitere cyclische bzw. arretierte Strukturen dar, bei denen die konformative Beweglichkeit im Molekül im Vergleich zu den Verbindungen **15** bis **19** eingeschränkt ist. Sie enthalten allerdings nicht das in den Verbindungen **21** bis **24** eingebaute hypothetische Pharmakophor **20**. Vielmehr handelt es sich um cyclisierte Carbonsäurehydrazid-Derivate. Diese enthalten im Vergleich zum hypothetischen Pharmakophor eine Carbonylfunktion weniger, stattdessen ist aber durch eine zusätzliche NH-Gruppe ein weiterer potentieller Wasserstoffbrücken-Donor enthalten.

Verschiedene Derivate der Strukturklasse **25** konnten basierend auf einer Vorschrift von Pal et al.⁹⁷ in einer zweistufigen Synthese hergestellt werden (Schema 4-15).



Schema 4-15: Darstellung der 4-Aryl-1(2H)-phthalazinone **25a-c**

Zunächst wurde 1,4-Dichlorphthalazin (**62**) mit einer äquimolaren Menge der nukleophilen Indolderivate **63a** oder **63b** bzw. 2-Naphthol (**65**) in Gegenwart von Aluminiumchlorid umgesetzt. Unter diesen Friedel-Crafts-Reaktionsbedingungen wird **62** zunächst durch Aluminiumchlorid aktiviert, gefolgt von einem nukleophilen Angriff durch

den Aromaten. Der Erfolg dieses Reaktionsschrittes hängt entscheidend von der Nukleophilie des verwendeten Aromaten ab. Eine weitere Substitution des noch verbleibenden Chloratoms wird in der Regel nicht beobachtet, was auf die durch den eingeführten Aromaten erhöhte π -Elektronendichte zurückzuführen ist.

Die Synthese von 4-(2-Hydroxy-1-naphthyl)-1(2*H*)-phthalazinon (**25c**) gelang unter diesen Reaktionsbedingungen nicht. Bereits der erste Reaktionsschritt, die nukleophile Substitution, war nicht erfolgreich. Es konnte zwar ein Produkt isoliert werden, die Auswertung der analytischen Daten ergab jedoch, dass es sich hierbei offensichtlich um 4-Chlor-1(2*H*)-phthalazinon (**67**) handelte.

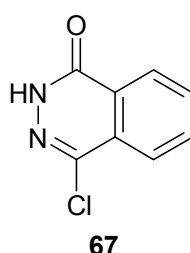
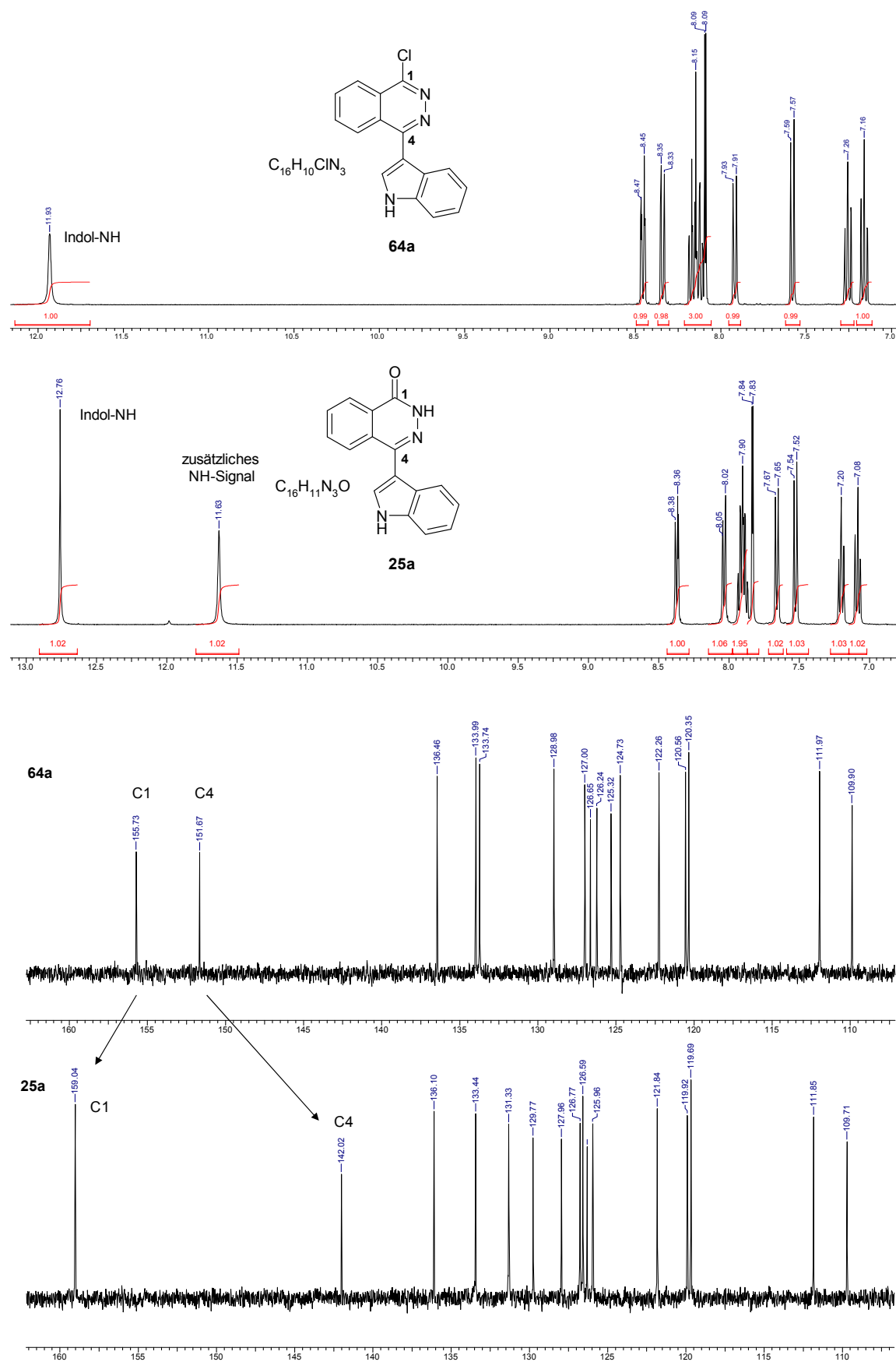


Abbildung 4-4: Beim Versuch der Darstellung von **25c** isolierte Substanz **67**

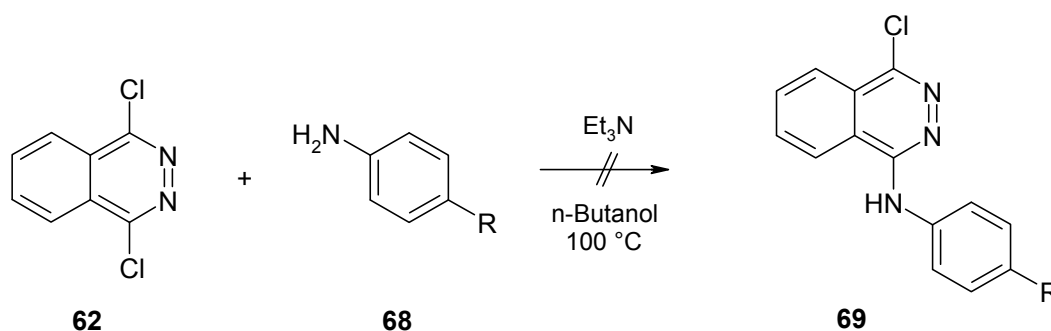
Die Synthese der Derivate **25a** und **25b** erfolgte hingegen problemlos. Die Zwischenprodukte **64a** und **b** konnten isoliert und anschließend zur Bildung der Phthalazinone **25** in Gegenwart von Natriumacetat in Essigsäure hydrolysiert werden.

Abbildung 4-5 zeigt die NMR-Spektren von **25a** und der Vorstufe **64a**. Die erfolgreiche Hydrolyse ist im ^1H -NMR-Spektrum durch ein zusätzliches Signal in Form eines Singuletts im tiefen Feld bei 11.63 ppm zu erkennen. Darüber hinaus hat die Aufhebung des aromatischen Phthalazin-Systems in **25a** zur Folge, dass kein Ringstrom mehr induziert wird, der für eine Tieffeld-Verschiebung der im Entschirmungsbereich liegenden Signale verantwortlich ist. Folglich ist bei **25a** im Vergleich zu **64a** eine Hochfeld-Verschiebung diverser Signale zu beobachten. Dieser Effekt tritt auch im ^{13}C -NMR-Spektrum auf. Hier kommt es zu einer Tieffeld-Verschiebung von C1 und zu einer Hochfeld-Verschiebung von C4.

Abbildung 4-5: Vergleich der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **64a** und **25a**

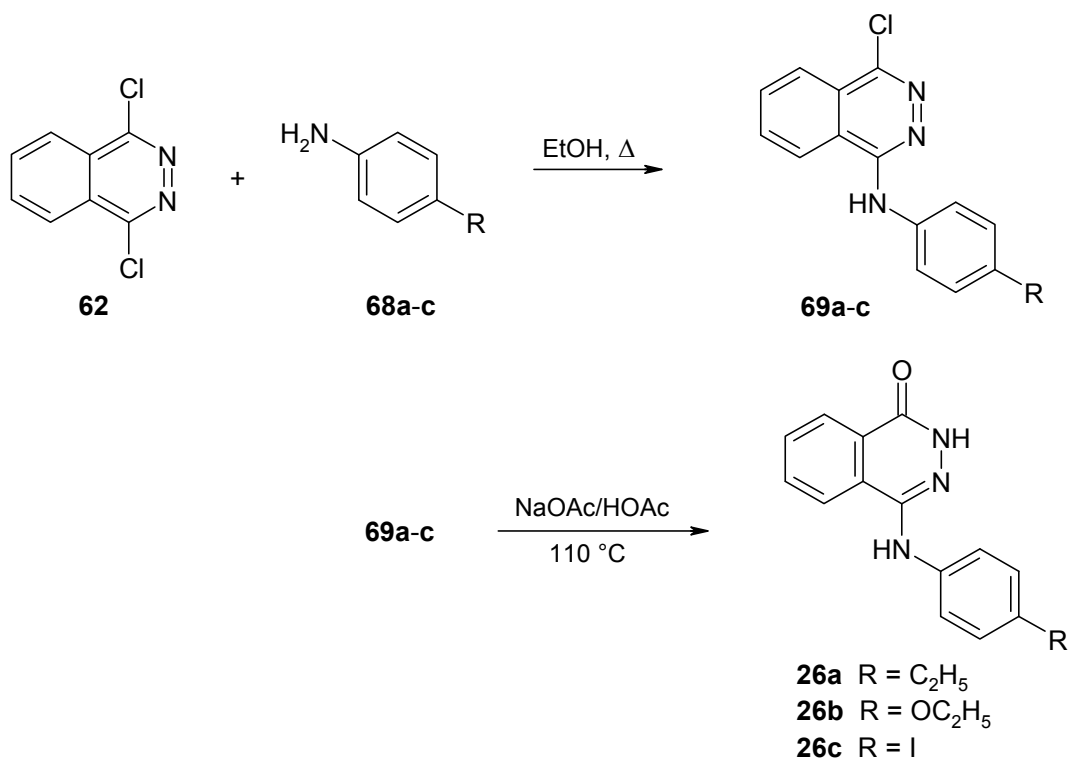
4.10 Synthese der 4-Anilino-1(2*H*)-phthalazinone **26**

Eine weitere Derivatisierung erfolgte durch Umsetzung von 1,4-Dichlorphthalazin (**62**) mit verschiedenen Anilinderivaten **68** und anschließender Hydrolyse zum entsprechenden Phthalazinon **26** (Schema 4-17). Der erste Syntheseschritt zur Bildung der *N*-(4-Chlorphthalazin-1-yl)-*N*-phenylamine **69** wurde zunächst nach einer Vorschrift von Guery et al.⁹⁸ durchgeführt. Eine Mischung aus **62**, dem entsprechend substituierten Anilin **68** und Triethylamin wurde in *n*-Butanol unter Stickstoffatmosphäre bei 100 °C gerührt (Schema 4-16). Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde jedoch lediglich ein komplexes Produktgemisch erhalten.



Schema 4-16: Versuch zur Darstellung der *N*-(4-Chlorphthalazin-1-yl)-*N*-phenylamine **69** nach Guery et al.⁹⁸

Die Synthese gelang nach einer Vorschrift von Mahmoud⁹⁹ durch Rückflusserhitzen eines Gemisches beider Edukte in Ethanol (Schema 4-17). Die Hydrolyse zum 4-Anilino-1(2*H*)-phthalazinon **26** erfolgte analog zur oben unter Abschnitt 4.9 genannten Vorgehensweise bei den Verbindungen **25**.



Schema 4-17: Darstellung der 4-Anilino-1(2H)-phthalazinone **26a-c**

4.11 Synthese der am Phenylring modifizierten *N'*-Aroyl-2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **27**

Unter Beibehaltung des in Verbindung **10** enthaltenen zentralen Strukturelements und des Indols sollten Veränderungen am Phenylring vorgenommen werden.

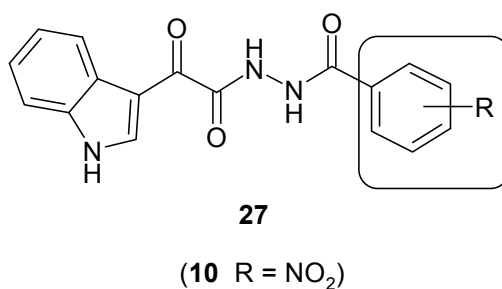
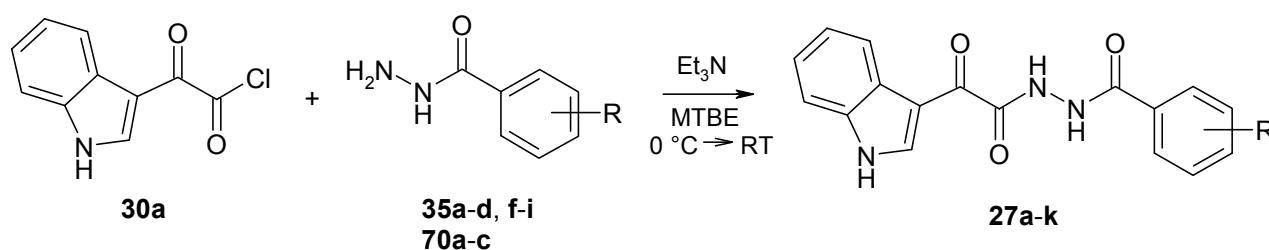


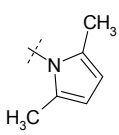
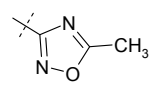
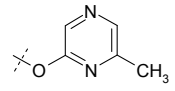
Abbildung 4-6: Grundstruktur der geplanten Verbindungen **27**

4.11.1 Synthese der *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **27a-k**

Zunächst wurden Derivate synthetisiert, bei denen der Phenylring in verschiedenen Positionen mit Resten unterschiedlicher Größe substituiert ist.

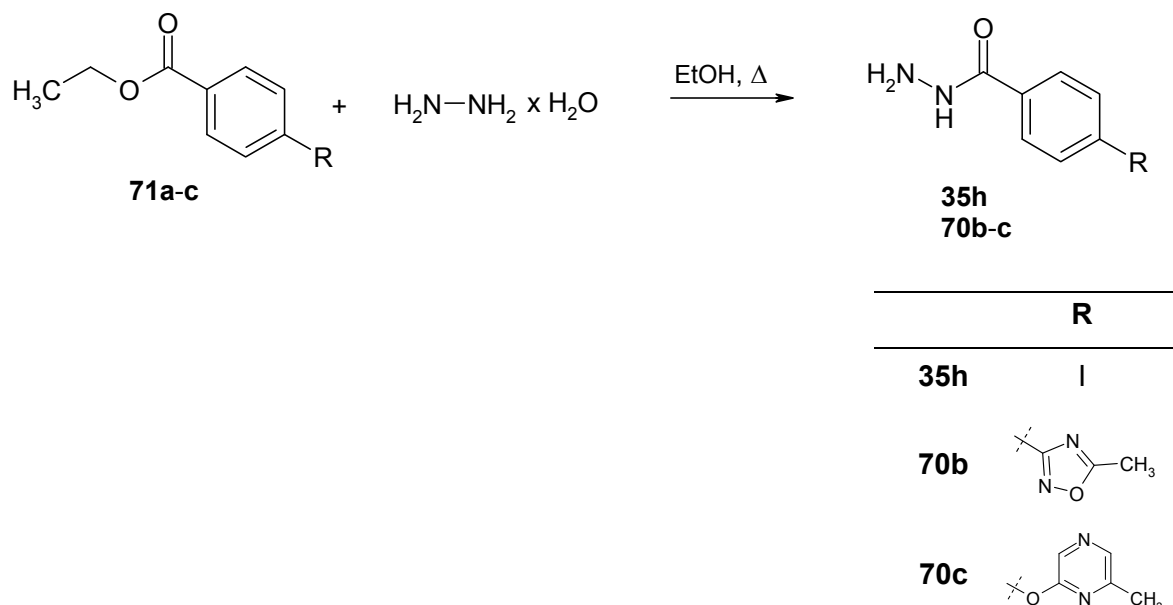
Die Verbindungen **27a-k** konnten in analoger Weise zu den *N'*-Aryl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydraziden **15** synthetisiert werden. 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**) wurde mit den entsprechend substituierten Benzhydraziden **35** bzw. **70** in MTBE in Anwesenheit der Hilfsbase Triethylamin bei 0 °C bzw. Raumtemperatur zu den gewünschten Produkten **27** umgesetzt (Schema 4-18).



27	R	27	R
a	4-H	g	4-I
b	4-CH ₃	h	2-F
c	4-OCH ₃	i	4- 
d	4-C(CH ₃) ₃	j	4- 
e	4-CF ₃	k	4- 
f	4-Cl		

Schema 4-18: Synthese der *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **27a-k**

4.11.1.1 Synthese der Benzhydrazide **35h**, **70b** und **70c**



Schema 4-19: Darstellung der Edukte **35h**, **70b** und **70c**

Die für die Bildung von **27g**, **j** und **k** benötigten Benzhydrazide waren nicht kommerziell verfügbar und mussten zunächst hergestellt werden. Der entsprechende Ethylester **71** wurde mit überschüssigem Hydrazin-Monohydrat in Ethanol zum Rückfluss erhitzt (Schema 4-19). Dabei variierten die Ausbeuten der Hydrazide in Abhängigkeit von der Stoffmenge des Hydrazin-Monohydrats und vom Wassergehalt des Ethanols, wobei jeweils analog zu den Vorschriften von Khan et al.¹⁰⁰ bzw. Sung und Lee¹⁰¹ gearbeitet wurde.

4.11.2 Besonderheit in den ¹H-NMR-Spektren der Verbindungsklassen **15**, **16**, **17** und **27**

Die Verbindungsklassen **15**, **16**, **17** und **27** sind von großer struktureller Ähnlichkeit. Beispielhaft sind hier die Verbindungen **15b**, **16c**, **17c** und **27f** aufgeführt. Sie beinhalten alle ein 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetyl-Gerüst, das mit einem para-Chlor-substituierten Phenylring verknüpft ist. Ein Unterschied besteht lediglich in der Art der Verknüpfung.

Alle Verbindungen zeigen im ^1H -NMR-Spektrum neben dem für 1,4-substituierte Phenylstrukturen typischen AA'XX'-Aufspaltungsmuster nahezu identische Signale für die Protonen 4''-H, 5''-H, 6''-H und 7''-H des Indols. Die Spektren der Verbindungen **16c** und **17c** zeigen darüber hinaus je ein Singulett für das Proton 2''-H und das Proton des Indol-Stickstoffs. Bei den Verbindungen **15b** und **27f** kann hingegen die Kopplung zwischen diesen Protonen beobachtet werden. Die Signale spalten in diesem Fall in Dubletts auf.

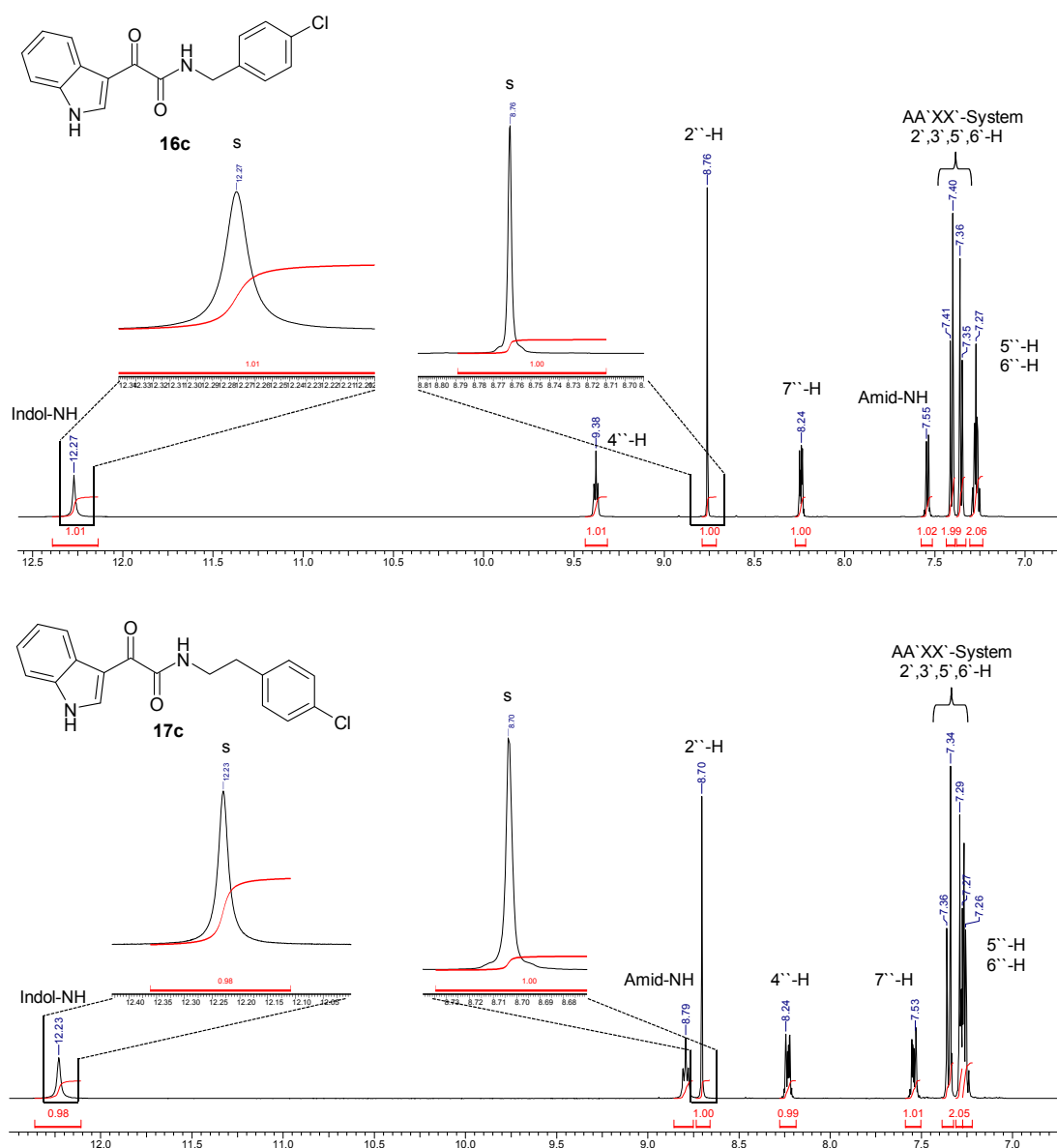
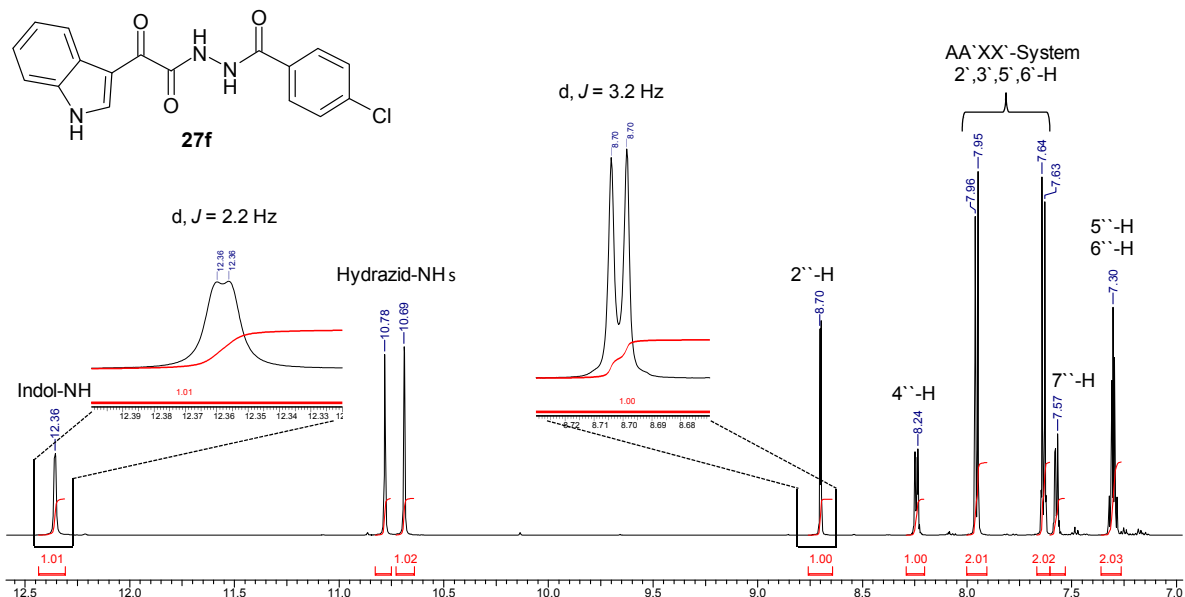


Abbildung 4-7: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen **16c** und **17c** bei einer Messfrequenz von 600 MHz im Lösungsmittel $\text{DMSO}-d_6$



4.11.3 Synthese der *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide 27l-q

Die Verbindungen **27l-q** sollten mit dem Ziel synthetisiert werden, möglichst voluminöse Reste am Phenylring einzufügen. Hintergrund dieser Überlegung war ein Docking von Verbindung **27d** in eine publizierte c-MET Kristallstruktur (PDB-ID: 3c1x)¹⁰², bei der es sich um ein Kokristallisat mit einem als Inhibitor fungierendem Pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazin-Derivat (**72**) handelt. Ein Docking der virtuellen, aus **27d** und **72** abgeleiteten Verbindung **72A** zeigte eine dem Inhibitor **72** sehr ähnliche Positionierung des Liganden in der Bindetasche.

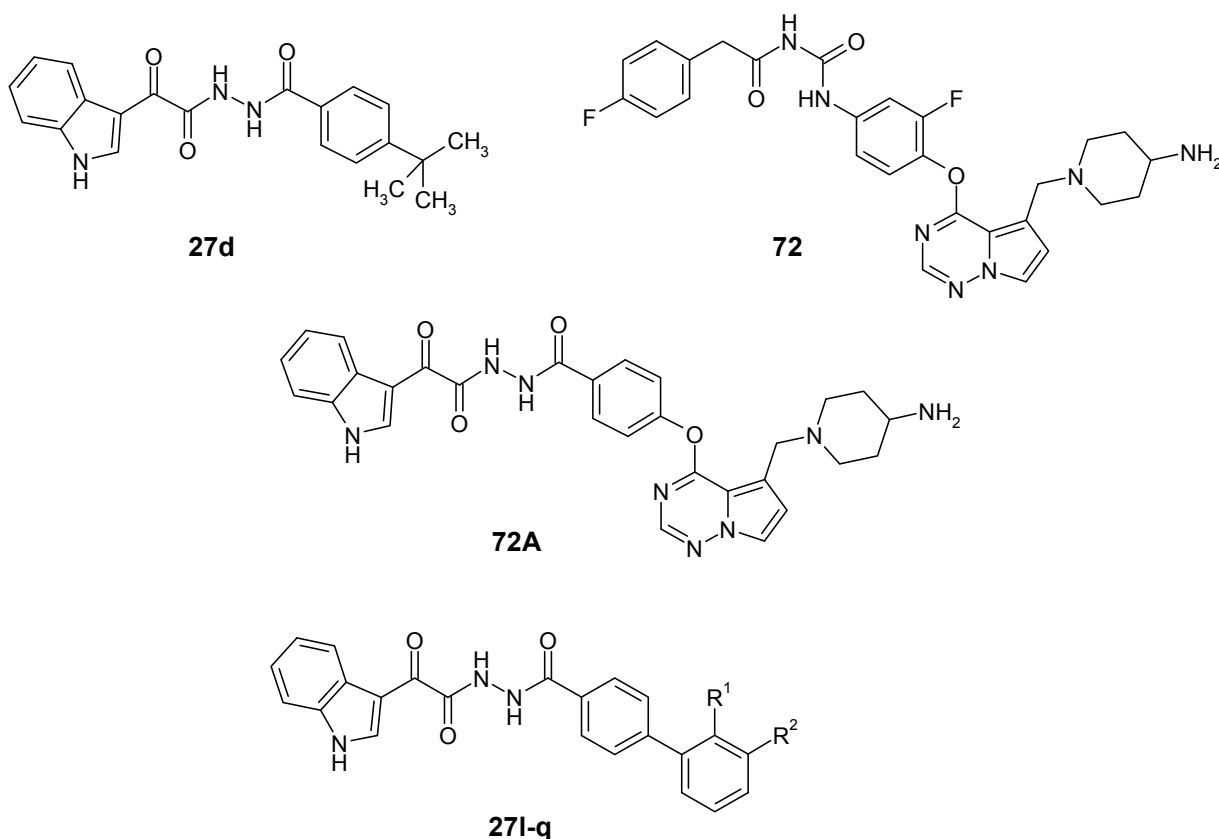


Abbildung 4-9: Aus **27d** und **72** abgeleiteter virtueller Ligand **72A** und daraus modellierte Strukturen **27l-q**

Die voluminösen Reste am Phenylring sollten im Rahmen einer Mikrowellen-unterstützten Suzuki-Kupplung in die Verbindungen eingeführt werden. Basierend auf den oben angesprochenen Docking-Ergebnissen wurden dafür Boronsäuren als Edukte

ausgewählt, die in Größe und Flexibilität in etwa dem substituierten Pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-Rest entsprachen.

4.11.3.1 Mikrowellen-induzierte Synthese

Die Durchführung von organischen Synthesen mit Hilfe von Mikrowellenöfen wurde erstmals 1986 von den Arbeitsgruppen um Gedye¹⁰³ und Giguere¹⁰⁴ beschrieben. Sie führten Hydrolysen, Oxidationen und Veresterungen in homo- und heterogenen Systemen durch, wobei sie beeindruckende Verringerungen der Reaktionszeiten im Vergleich zu konventionell durchgeführten Synthesen feststellen konnten.

Seit diesem Zeitpunkt ist das Interesse an Mikrowellen-unterstützten Verfahren zur Synthese organischer Verbindungen kontinuierlich gestiegen und zahlreiche Beiträge zur sogenannten MAOS (*microwave-assisted organic synthesis*) wurden veröffentlicht. Die erfolgreiche Etablierung der Anwendung von Mikrowellen ist nicht nur auf die Verkürzung von Reaktionszeiten zurückzuführen. Die enormen Aufheizraten ermöglichen mitunter Reaktionen, die mit konventionellen Heizmethoden nicht realisierbar sind. Darüber hinaus lassen sich unter milden Reaktionsbedingungen höhere Ausbeuten und höhere Produktreinheiten erzielen.¹⁰⁵ Zudem kann die Reproduzierbarkeit von Synthesen verbessert werden.¹⁰⁶

Das Erwärmen mit Mikrowellen basiert auf dem Bestreben von Dipolen bzw. Ionen, sich am elektromagnetischen Feld auszurichten. Da dieses Feld oszilliert, kommt es zu einer ständigen Neuausrichtung der Dipole bzw. Ionen, wobei durch Molekularreibung und Dielektrizitätsverlust Energie in Form von Wärme frei wird. Mikrowellen sorgen auf diese Weise für eine effiziente Energieübertragung in den zu erwärmenden Reaktionsgemischen. Die Voraussetzung für dieses sogenannte dielektrische Erhitzen ist die Fähigkeit eines Stoffes, Mikrowellen zu absorbieren und in Wärme umzuwandeln. In welchem Ausmaß ein Stoff bei gegebener Frequenz und Temperatur dazu in der Lage ist, wird durch den Verlustfaktor $\tan \delta$ bestimmt. Dieser ist definiert als Quotient aus Dielektrizitätsverlust ε'' und Dielektrizitätskonstante ε' . ε'' steht für die Effizienz der Umwandlung elektromagnetischer Strahlung in Wärme, ε' für die Polarisierbarkeit der Moleküle durch das elektrische Feld. Für eine effiziente Absorption und damit ein schnelles Aufheizen wird ein großer Verlustfaktor $\tan \delta$ vorausgesetzt. Eine Einteilung kann danach in stark ($\tan \delta > 0.5$), mittel ($\tan \delta 0.1-0.5$) und schwach ($\tan \delta < 0.1$)

Mikrowellen-absorbierende Stoffe erfolgen. Viele Lösungsmittel sind in dieser Form kategorisiert. Niedrige Verlustfaktoren schließen die Verwendung eines Lösungsmittels nicht generell aus, da die dielektrischen Eigenschaften der sonstigen Bestandteile des Reaktionsgemisches für das Erhitzen mit Mikrowellen meist ausreichen. Zu diesem Zweck kann auch ein Zusatz von ionischen Flüssigkeiten als polare Additiva erfolgen.¹⁰⁶

Neben der Eigenschaft, elektromagnetische Energie in Wärme umzuwandeln, werden weitere thermische Effekte diskutiert, die bei konventionellem Erhitzen nicht auftreten. Dazu gehören Effekte wie selektives Erhitzen einzelner Komponenten des Systems und auch der Überhitzungseffekt von Lösungsmitteln.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Dieser wurde erstmals von Giguere und Mitarbeitern¹⁰⁴ beobachtet, die feststellten, dass Lösungsmittel mit Hilfe von Mikrowellen in Abhängigkeit ihrer Dielektrizitätskonstanten weit über ihre Siedepunkte bei Atmosphärendruck erhitzt werden können. Als weiterer thermischer Effekt gilt das Auftreten inverser Temperaturgradienten. Durch Mikrowellenbestrahlung wird die Energie direkt auf die Moleküle des Reaktionsgemisches übertragen. Die Erwärmung erfolgt somit von innen. Hierdurch können Wandeffekte, wie z. B. eine beschleunigte Katalysatordesaktivierung, beseitigt werden, die bei konventionellen Methoden durch primäres Erhitzen des Reaktionsgefäßes auftreten.^{105,106,109,110} Neben diesen thermischen Effekten stehen nicht-thermische Effekte zur Diskussion. Diese werden auf direkte Wechselwirkungen zwischen dem elektromagnetischen Feld und Molekülen des Reaktionsgemisches zurückgeführt.^{105,106}

Während früher die Synthesen in handelsüblichen Haushaltsmikrowellen durchgeführt wurden, bei denen weder Mikrowellenleistung noch Druck und Temperatur hinreichend kontrolliert werden konnten, stehen inzwischen moderne Synthesemikrowellen zur Verfügung, die eine exakte Steuerung der Reaktionsparameter gewährleisten. Dabei können die Synthesen in offenen oder geschlossenen Systemen erfolgen. Des Weiteren stehen Multi- und Monomode-Geräte zur Verfügung. Mit Multimode-Geräten können mehrere Reaktionsgefäße gleichzeitig bestrahlt werden. Sie eignen sich somit zur Parallelsynthese. Im Gegensatz dazu kann in Monomode-Geräten immer nur ein Reaktionsgefäß bestrahlt werden. Doch auch dieses Verfahren kann inzwischen so weit automatisiert werden, dass mit beiden Gerätetypen heute hohe Durchsätze erzielt werden können.¹⁰⁶ Die üblicherweise verwendeten Geräte arbeiten bei einer Frequenz von 2.45 GHz.^{106,108,111} Die maximale Größe der Reaktionsgefäße wird somit durch die Reichweite der Mikrowellen begrenzt.¹¹⁰ Mittlerweile stehen ausreichend große

Reaktionsgefäße sowie Durchflussreaktoren zur Verfügung, mit denen Substanzen mit Hilfe von Mikrowellentechnik im Kilogramm-Maßstab hergestellt werden können.¹⁰⁶

Besonders geeignet ist die MAOS für Übergangsmetall-katalysierte C-C-Verknüpfungen, wie z. B. Suzuki-Kupplungen. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und werden im Folgenden näher erläutert.

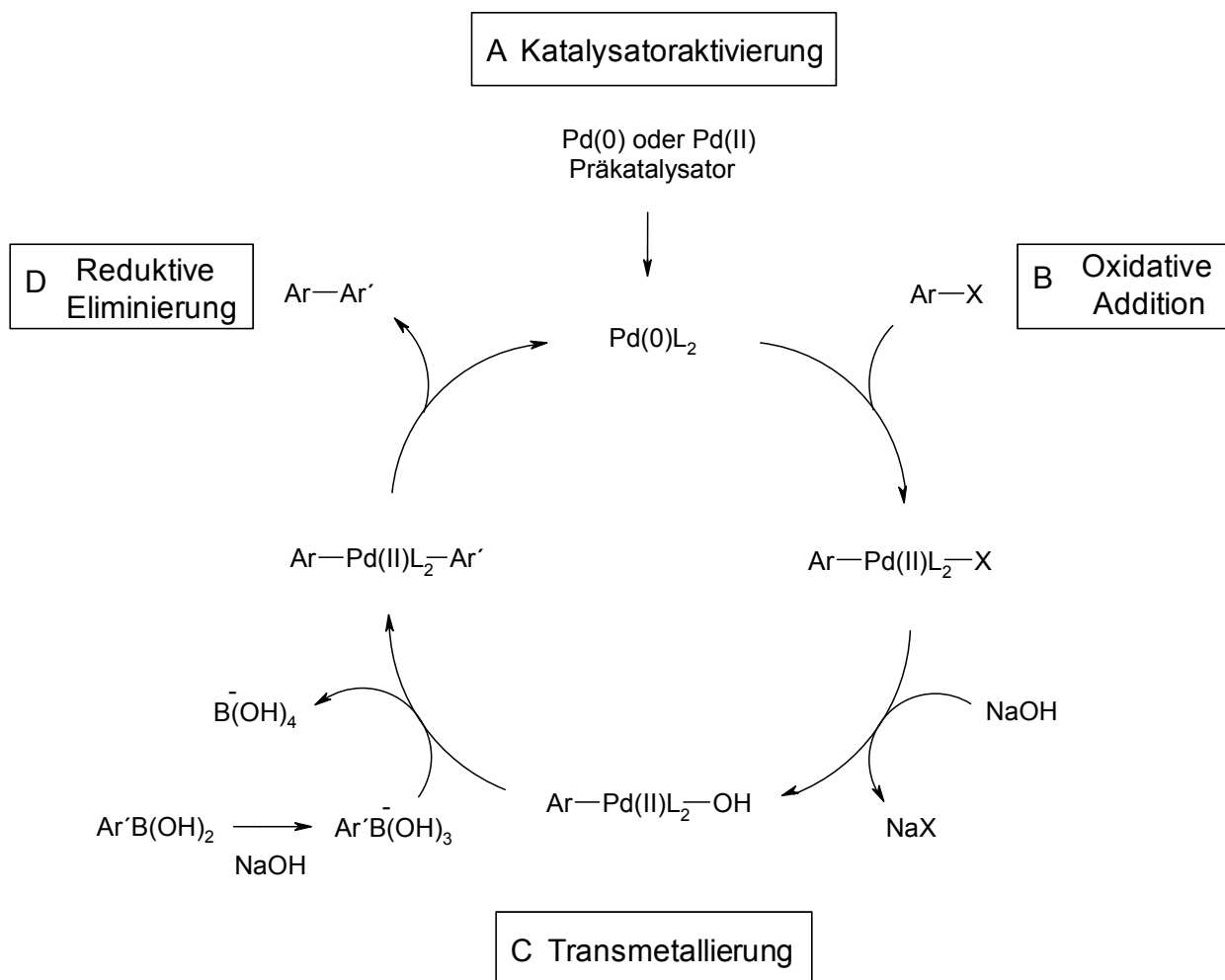
4.11.3.2 Suzuki-Kupplung zur Darstellung von Biphenylstrukturen

Die Suzuki-Kupplung ist neben der Stille-Kupplung¹¹² und der Heck-Reaktion¹¹³ eine der wichtigsten Palladium-katalysierten C-C-Verknüpfungsreaktionen. Die Vielzahl der Veröffentlichungen über Untersuchungen und Anwendungen der Suzuki-Kupplung seit der erstmaligen Erwähnung durch Miyaura und Suzuki¹¹⁴ im Jahr 1979 verdeutlichen die große Bedeutung dieser Kreuzkupplungs-Reaktion in der präparativen organischen Chemie.

Bei der Suzuki-Kupplung werden Organoborverbindungen mit Aryl-, Alkenyl- oder Alkynylhalogeniden in Anwesenheit eines Palladium-Katalysators sowie einer Base umgesetzt. Neben Halogeniden kommen auch Trifluormethansulfonsäureester, sogenannte Triflate, als Kupplungspartner zum Einsatz, die im Vergleich zu den Halogeniden jedoch instabiler und teurer sind.¹¹⁵ Als Organoborverbindungen dienen in der Regel Boronsäuren und deren Derivate.^{115,116}

Neben den milden Reaktionsbedingungen, unter denen sich Suzuki-Kupplungen durchführen lassen, stellen vor allem die kommerzielle Verfügbarkeit und die gute synthetische Zugänglichkeit zahlreicher Boronsäuren sowie deren Umweltverträglichkeit und Stabilität entscheidende Vorteile der Suzuki-Kupplung gegenüber Kupplungsreaktionen mit typischen Organometall-Verbindungen dar.^{115,117,118}

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Suzuki-Kupplung ausschließlich Biarylstrukturen synthetisiert werden. Bei den folgenden Ausführungen zum Mechanismus dieser Reaktion werden deswegen nur Umsetzungen mit Arylverbindungen berücksichtigt.



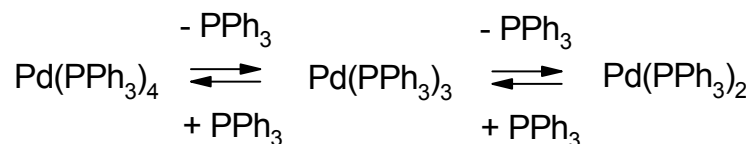
Schema 4-20: Katalysezyklus der Suzuki-Kupplung (modifiziert nach Martin¹¹⁸ und Kotha¹¹⁷)

(L = Ligand, Ar = Aryl-Rest; Der Übersichtlichkeit halber wurde Pd(0)L₂ als aktivierte Palladium-Spezies verwendet. Darüber hinaus sind keine *cis-/trans*-Isomere dargestellt. Als Base wurde beispielhaft Natriumhydroxid verwendet. Nähere Erläuterungen dazu sind im Text zu finden.)

Der Mechanismus der Suzuki-Kupplung lässt sich am besten durch einen katalytischen Zyklus beschreiben (Schema 4-20).^{115,117}

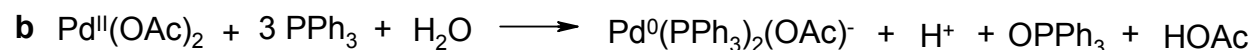
Zunächst erfolgt die Überführung des Palladium-Präkatalysators in eine aktive Palladium(0)-Spezies (**A**). Sehr häufig kommen Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) oder auch Palladium(II)acetat mit oder ohne Zusatz von Liganden zum Einsatz.^{115,117}

Bei stabilen Palladium(0)-Ligand-Komplexen wie $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ bildet sich zunächst im Rahmen einer Gleichgewichtsreaktion die aktive Spezies $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$.^{119,120}



Schema 4-21: Gleichgewichtsreaktion zwischen den verschiedenen Palladium(0)-Ligand-Komplexen

Palladium(II)-Salze werden hingegen durch in situ-Reduktion zu Palladium(0) aktiviert. Hierbei spielen Zusätze von Liganden oder Additiven wie Tetraalkylammoniumhalogenide eine wichtige Rolle bezüglich der Aktivität und Stabilität der entstehenden Palladium(0)-Komplexe.^{117,120,121} Ursprünglich wurde angenommen, dass die Zugabe von Phosphinliganden zu einer Palladium(II)-Spezies abermals zur Bildung von $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$ führt (Schema 4-22a).¹²⁰ Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es stattdessen zu einer Bildung von anionischen Palladium(0)-Komplexen kommt (Schema 4-22b).^{119,122,123}



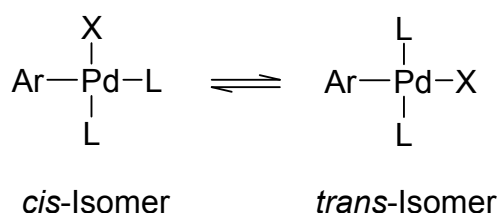
Schema 4-22: In situ-Aktivierung von Palladium(II)acetat

In Liganden-freien Systemen wird die Reduktion der Palladium(II)-Spezies zu Palladium(0) durch Bestandteile des Reaktionsansatzes, wie z. B. den Organometallverbindungen, gewährleistet.^{114,119} Zudem kann sich hier ein Zusatz von Tetraalkylammoniumhalogeniden durch Ausbildung stabiler, anionischer Palladium-Komplexe günstig auf die Aktivität des Liganden-freien Katalysators auswirken.^{117,124}

Auch wenn bereits einige Intermediate bei der Katalysatoraktivierung identifiziert werden konnten, bleibt festzuhalten, dass die Mechanismen, die zur Bildung der aktiven Palladium-Spezies führen, noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Der Übersichtlichkeit halber wird im weiteren Verlauf der Komplex $\text{Pd}(0)\text{L}_2$ verwendet.

Nach der Erzeugung der für die Reaktion notwendigen Palladium(0)-Spezies erfolgt die oxidative Addition (**B**) des Arylhalogenids an den Komplex $\text{Pd}(0)\text{L}_2$ unter Bildung einer Palladium(II)-Spezies. Dieser Schritt ist häufig geschwindigkeitsbestimmend. Die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt in Abhängigkeit vom Halogenid bzw. Triflat in der Reihenfolge $\text{I} > \text{OTf} > \text{Br} \gg \text{Cl}$.¹¹⁵

Die aus der oxidativen Addition hervorgehenden Addukte können als *cis*- oder *trans*-Isomer vorliegen. Als kinetisches Produkt wird häufig die *cis*-Form gebildet. Das thermodynamisch stabilere Isomer stellt jedoch das *trans*-Produkt dar. Da die weitere Reaktion nur ausgehend vom *cis*-Isomer erfolgen kann, kommt es hier zu *cis/trans*-Isomerisierungen.¹²⁵



Schema 4-23: *cis*- und *trans*-Addukt der oxidativen Addition

Im nächsten Schritt kommt es zur Übertragung des organischen Restes Ar' der Borverbindung auf das Palladium. Aus dieser als Transmetallierung (**C**) bezeichneten Reaktion geht eine Palladium(II)-Spezies hervor, die nun die beiden zu verknüpfenden organischen Reste Ar und Ar' enthält. Die Transmetallierung gilt als besonders kompliziert. Die möglichen Mechanismen dieser Reaktion werden kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu anderen Kreuzkupplungsreaktionen kann die Transmetallierung bei der Suzuki-Kupplung an verschiedenen Palladium(II)-Spezies in der Reaktionslösung ablaufen, deren Zusammensetzung sich beim Wechsel von Lösungsmittel, Reagenz oder Katalysator überdies noch ändern kann. So kommt es nach der oxidativen Addition in Abhängigkeit der verwendeten Base zunächst zu einem Austausch des Halogenid-

Ions unter Ausbildung eines Organopalladium-Alkoxids oder –Hydroxids (Ar-Pd-OR bzw. Ar-Pd-OH). Im dargestellten Zyklus wurde beispielhaft Natriumhydroxid als Base verwendet. Auf diese Alkoxid- bzw. Hydroxid-Intermediate wird dann der Aryl-Rest der Borverbindung übertragen. Hierbei handelt es sich um eine nukleophile Substitution. Die Boronsäuren müssen dafür durch den Zusatz einer Base aktiviert werden. Dies ist eine Besonderheit der Suzuki-Kupplung, denn im Gegensatz zur Heck-Reaktion und zur Stille-Kupplung findet unter neutralen Reaktionsbedingungen in der Regel keine bzw. nur eine verzögerte Kupplung statt. Es kommen zahlreiche anorganische Basen wie Carbonate, Phosphate und Hydroxide, aber auch organische Basen wie Acetate, Alkoholate, Triethylamin oder 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) zum Einsatz. Darüber hinaus kann die Reaktivität der Borverbindungen auch durch das Lösungsmittel oder Additiva wie Tetraalkylammoniumhalogenide beeinflusst werden.^{115,117,118}

Unter Regeneration des Katalysators zum Palladium(0)-Komplex folgt im letzten Schritt die reduktive Eliminierung (**D**) zum gewünschten Substitutionsprodukt. Auch dieser Schritt erfolgt ausgehend vom *cis*-Isomer, so dass eine ggf. vorliegende *trans*-Form erst nach Isomerisierung zum entsprechenden *cis*-Komplex umgesetzt wird.¹¹⁵

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die sich auf einzelne Reaktanden der Suzuki-Kupplung fokussieren. Prinzipiell eignen sich z. B. Aryliodide und –bromide mit elektronenziehenden Substituenten sehr gut als elektrophile Edukte.¹¹⁷ Dass sie sich bezüglich der Kupplungsgeschwindigkeiten mitunter gravierend unterscheiden und Arylchloride generell als reaktionsträge einzustufen sind, wurde bereits erwähnt. In den letzten Jahren wurden zudem Kupplungen von Organoborverbindungen mit Allyl- und Arylethern, Arylcarbamaten, -carbonaten, -sulfamaten und anderen beschrieben.¹²⁶⁻¹²⁸

Neben Palladium konnten auch andere Metalle wie Nickel¹²⁸, Kupfer¹²⁹ und Gold¹³⁰ erfolgreich als Katalysatoren zur Kupplung von Organoborverbindungen eingesetzt werden. Darüber hinaus besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer Liganden, da diese, wie z. B. die oft verwendeten Phosphine, mitunter sehr instabil sind oder verstärkt zur Bildung von Nebenprodukten beitragen.^{117,131} Inzwischen sind viele neue und optimierte Katalysatorsysteme bekannt, mit denen zahlreiche Suzuki-Kupplungen auch mit reaktionsträgen Edukten, wie z. B. Arylchloriden, problemlos gelingen.¹³¹⁻¹⁴²

Einen besonderen Stellenwert haben Mikrowellen-induzierte Suzuki-Reaktionen eingenommen. Viele Synthesen lassen sich innerhalb kürzester Reaktionszeiten durchführen. Vor allem Suzuki-Kupplungen in Wasser sind problemlos durchführbar und haben im Sinne einer *green chemistry* große Bedeutung erlangt.^{109,111,143} Wasser eignet sich nicht nur aufgrund seines vergleichsweise hohen Verlustfaktors als Lösungsmittel für Mikrowellensynthesen. Mit zunehmendem Druck und Temperaturen weit über dem normalen Siedepunkt bei Atmosphärendruck verändert Wasser seine Lösungseigenschaften und ist in der Lage auch organische Substanzen zu lösen.^{144,145} Zudem ist Wasser billig, nicht brennbar und ungiftig, was entscheidende Vorteile gegenüber organischen Lösungsmitteln sind.¹⁰⁶

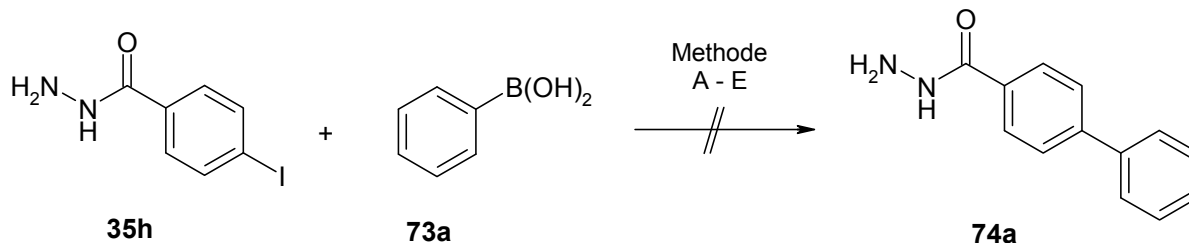
4.11.3.3 Mikrowellen-unterstützte Suzuki-Kupplung zur Darstellung der *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **27l-q**

Die Verbindungen sollten im Rahmen einer mehrstufigen Synthese hergestellt werden. Die Synthese des als Ausgangsverbindung benötigten 4-Iodbenzhydrazids **35h** wurde bereits unter 4.11.1.1 beschrieben.

Ausgehend von **35h** sollte im nächsten Schritt im Rahmen einer Suzuki-Kupplung eine Verknüpfung mit verschiedenen Boronsäure-Derivaten **73** erfolgen.

Es wurden zunächst diverse Reaktionsbedingungen mit Phenylboronsäure (**73a**) als Modellsubstanz getestet (Schema 4-24). Dabei lag ein Schwerpunkt auf Mikrowellen-induzierten Syntheseverfahren. Neben der Testung unterschiedlicher Mikrowellen-energien wurden die Versuche mit zwei bei Kupplungsreaktionen gängigen Palladium-katalysatoren durchgeführt: Palladium(II)acetat und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0). Darüber hinaus kamen verschiedene Basen zum Einsatz, wobei es sich einerseits um die anorganischen Salze Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat und andererseits um die organische, bicyclische Amidinbase DBU handelte, die von Chanthavong und Leadbeater¹¹¹ bei einer Vielzahl von Mikrowellen-induzierten Suzuki-Kupplungen erfolgreich eingesetzt werden konnte. Des Weiteren wurden Versuche mit dem Phasentransferkatalysator TBAB durchgeführt. Dieser soll in wässrigen Systemen die Löslichkeit der Reaktanden verbessern und zugleich der Aktivierung der Boronsäuren dienen.¹⁰⁹ Darüber hinaus wurden verschiedene Lösungsmittel getestet. Die Tabelle in Schema 4-24 gibt einen Überblick über die durchgeführten Synthesen und

die daran angeschlossene Form der Aufarbeitung. Leider gelang in keinem Fall eine Umsetzung zum bzw. eine Isolierung des gewünschten Endprodukts.

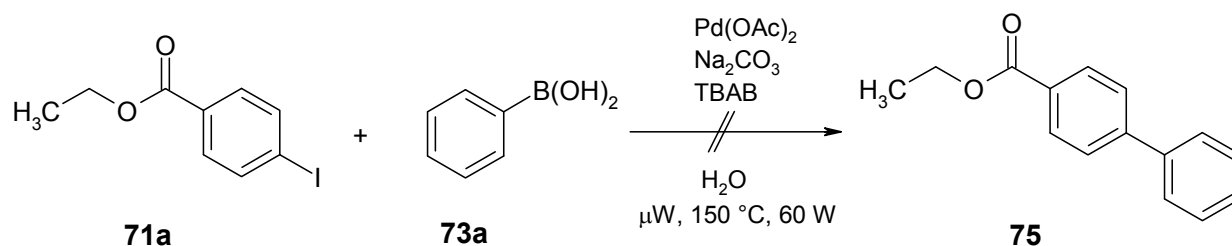


Methode	Reaktionsparameter	Katalysator	Base	LM	Add.	Aufarbeitung
A	μW (150W), 150°C, 5min ¹⁰⁹	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,4 mol%)	Na_2CO_3	H_2O	TBAB	Extraktion mit Et_2O und EtOAc ; Säulenchromato- graphie
B	μW (60W), 150°C, 5min ¹⁰⁹	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,4 mol%)	Na_2CO_3	H_2O	TBAB	Extraktion mit EtOAc ; präparative HPLC
C	μW (150W), 150°C, 5min ¹¹¹	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,4 mol%)	DBU	$\text{H}_2\text{O}/$ EtOH	-	Niederschlag abfiltriert
D	μW (150W), 150°C, 5min	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5 mol%)	DBU	$\text{H}_2\text{O}/$ EtOH	-	Niederschlag abfiltriert; Umkristallisation
E	konv. Erhitzen ¹⁴⁶	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10 mol%)	NaHCO_3	$\text{H}_2\text{O}/$ Toluen	-	Extraktion mit EtOAc ; Umkristallisation

Schema 4-24: Versuche zur Darstellung der 1,1'-Biphenyl-4-carbohydrazide **74**

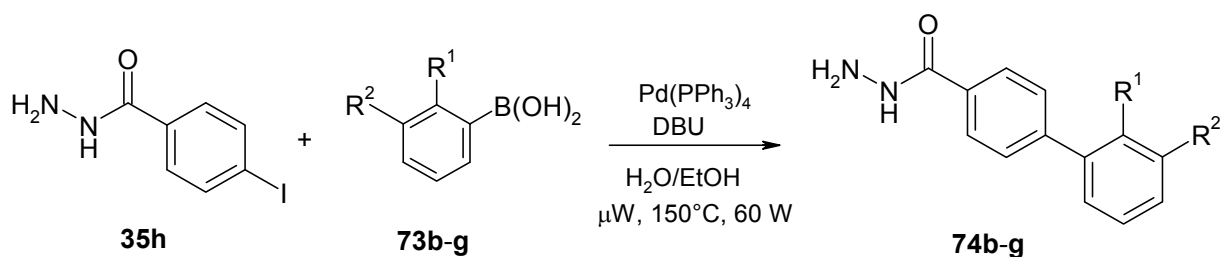
(Add. = Additivum, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, LM = Lösungsmittel, μW = Mikrowelle, TBAB = Tetrabutylammoniumbromid)

Auch der Versuch der Suzuki-Kupplung von 4-Iodbenzoesäureethylester (**71a**) mit Phenylboronsäure (**73a**) blieb unter den in Schema 4-25 angegebenen Reaktionsbedingungen erfolglos.



Schema 4-25: Versuch zur Darstellung von **75**

In der Literatur zu der sehr häufig und ausführlich beschriebenen Suzuki-Kupplung findet man oft Hinweise darauf, dass ein erfolgreicher Reaktionsverlauf nicht nur von den Reaktionsbedingungen, sondern auch sehr von der Art der eingesetzten Edukte abhängt, also z. B. von den Eigenschaften eventueller Substituenten am Arylhalogenid bzw. an der Boronsäure. Da somit eine generelle Übertragbarkeit der Reaktionsbedingungen von unsubstituierter auf substituierte Phenylboronsäure in Frage gestellt werden musste, wurde von weiteren Versuchen mit der Modellschubstanz abgesehen. Die bei der Synthese der Modellschubstanz für am besten befundenen Reaktionsbedingungen wurden nun direkt an den substituierten Boronsäuren getestet. Nach einer abgewandelten Vorschrift von Chanthavong und Leadbeater¹¹¹, die Palladium(II)acetat als Katalysator verwendet haben, wurde 4-Iodbenzhydrazid (**35h**) mit einem geringen Überschuss der entsprechenden Boronsäure **73** sowie 5 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und DBU als Base in einem Mikrowellenglas vermischt und mit gleichen Teilen Wasser und Ethanol versetzt. Nach zehnminütigem Erhitzen im Synthesemikrowellengerät bei $150\text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Mikrowellenenergie von 60 Watt konnten nach der Aufarbeitung die gewünschten Produkte **74** in Ausbeuten von 80 bis 95%, bezogen auf die nicht gereinigten Produkte, isoliert werden (Schema 4-26).

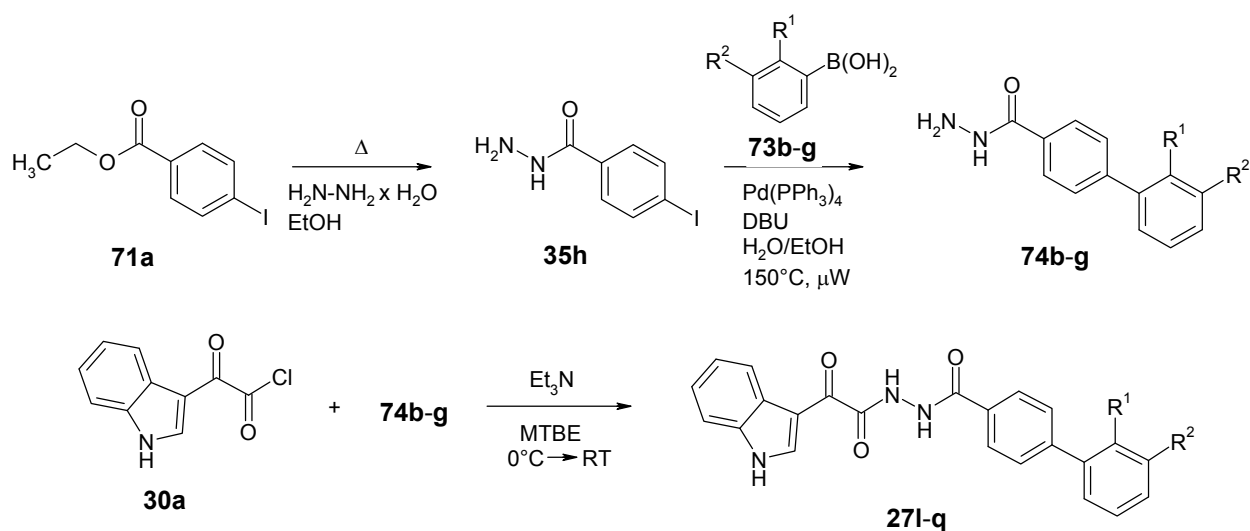


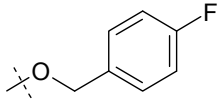
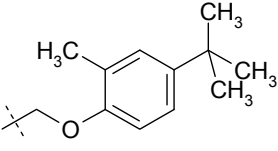
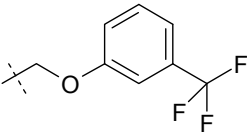
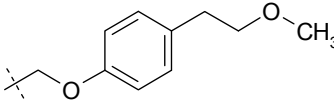
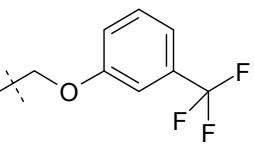
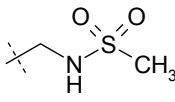
73/ 74	R ¹	R ²	73/ 74	R ¹	R ²
b		H	e	H	
c		H	f	H	
d	H		g	H	

Schema 4-26: Synthese der biphenylischen Hydrazide **74b-g**

Die 1,1'-Biphenyl-4-carbohydrazide **74b-g** wurden schließlich in einem letzten Schritt mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**) nach der unter Abschnitt 4.11.1 beschriebenen Methode zu den entsprechenden *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydraziden **27l-q** umgesetzt.

Schema 4-27 zeigt die dreistufige Synthesesequenz zur Darstellung der Verbindungen **27l-q**.



27	R ¹	R ²	27	R ¹	R ²
l		H	o	H	
m		H	p	H	
n	H		q	H	

Schema 4-27: Dreistufige Synthese der Biphenyl-Verbindungen **27l-q**

4.12 Synthese der am Indol substituierten *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **28**

Auf Basis der Verbindung **27d** sollten nun Modifikationen am Indolsystem vorgenommen werden. Dabei wurden zum einen kleinere Substituenten in Position 5 des Indols eingeführt, zum anderen erfolgten auch hier Substitutionen mit komplexen aromatischen Resten, die durch neue C-C-Verknüpfungen in das Molekül eingefügt wurden.

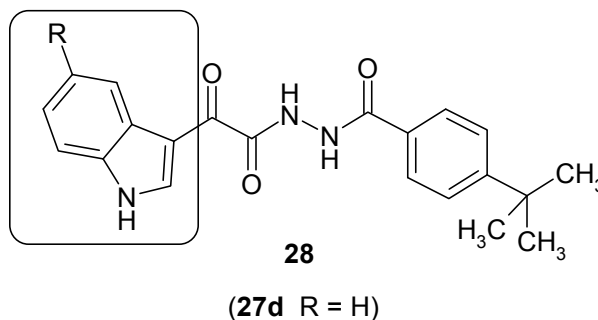
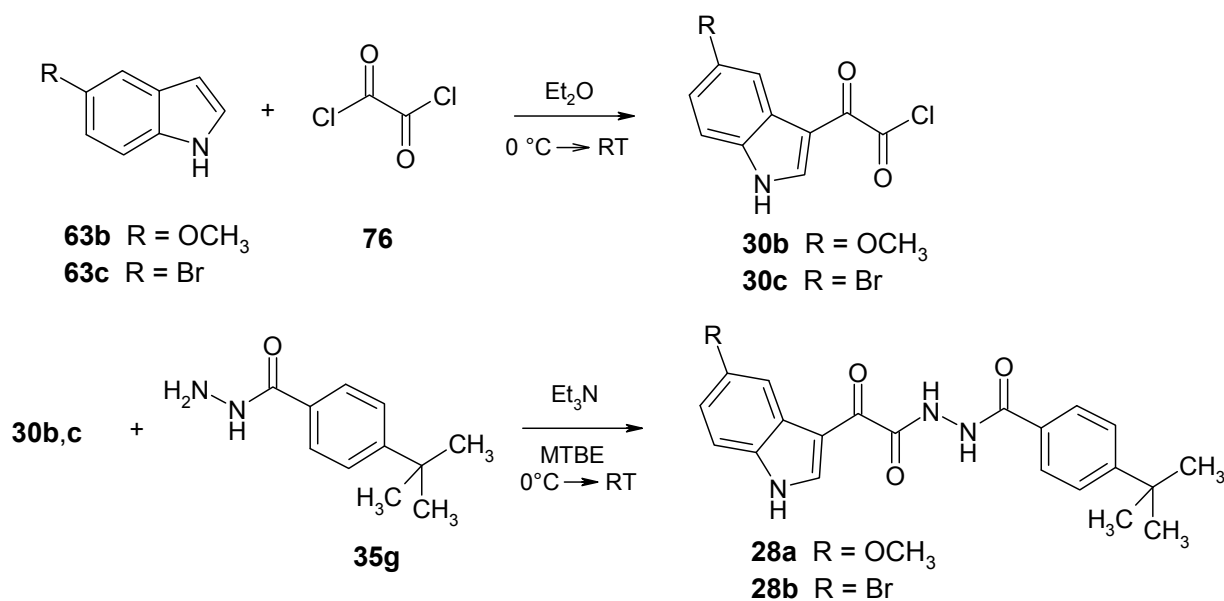


Abbildung 4-10: Grundstruktur der von **27d** abgeleiteten Verbindungen **28**

4.12.1 Synthese der *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **28a** und **28b**

Die Verbindungen **28a** und **28b** konnten im Rahmen einer zweistufigen Synthese erhalten werden (Schema 4-28)



Schema 4-28: Darstellung der Verbindungen **28a** und **28b**

Die kommerziell verfügbaren Indol-Derivate **63b** und **63c** wurden in getrocknetem Diethylether bei 0 °C mit Oxalylchlorid (**76**) versetzt und für einige Stunden bei Raumtemperatur gerührt.¹⁴⁷ Die im Verlauf der Reaktion ausgefallenen, in Position 5 substituierten 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchloride **30b** und **30c** konnten anschließend nach bekannten Verfahren zu den Endprodukten **28a** und **28b** umgesetzt werden.

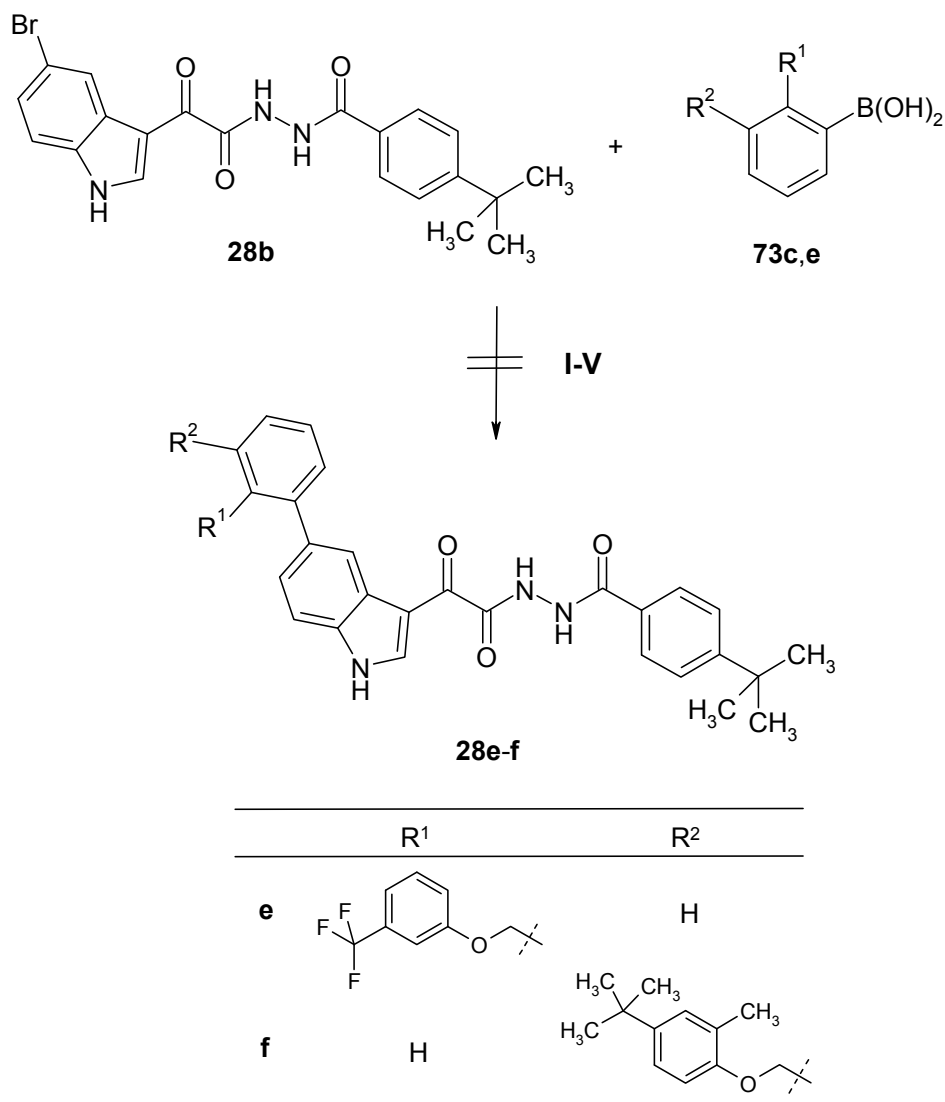
4.12.2 Mikrowellen-induzierte Suzuki-Kupplung zur Darstellung der *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **28c-f**

Die Einführung komplexer, aromatischer Reste in Position 5 der Indole sollte auch hier mittels Mikrowellen-induzierter Suzuki-Kupplung erfolgen.

Da Verbindung **28b** nach dem in Schema 4-28 dargestellten Verfahren synthetisch gut zugänglich war und als Arylhalogenid prinzipiell als Edukt für eine Suzuki-Kupplung fungieren kann, wurde zunächst versucht, ausgehend von dieser Verbindung die Boronsäuren **73** in Position 5 des Indols einzubringen. Schema 4-29 zeigt die durchgeführten Syntheseveruche.

Die Übertragung des bei der Umsetzung von 4-Iodbenzhydrazid (**35h**) erfolgreich angewendeten Mikrowellenverfahrens mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und DBU in einem Wasser-Ethanol-Gemisch auf die Umsetzung von **28b** blieb erfolglos (Schema 4-29-I). Auch nach insgesamt dreißigminütiger Reaktionszeit erfolgte keine vollständige Umsetzung der Edukte. Der Einsatz der Boronsäure im Überschuss und auch die Erhöhung der Katalysatorkonzentration von 5 mol% auf 7 mol% führten zu keiner Verbesserung der Umsetzung. Das gleiche gilt für einen überschüssigen statt äquimolaren Einsatz der Base DBU. In allen Fällen wurden komplexe Produktgemische erhalten.

Auch die Mikrowellen-unterstützte Suzuki-Kupplung in Anwesenheit von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und Cäsiumcarbonat in 1,4-Dioxan in Anlehnung an eine Vorschrift von Bagley und Mitarbeitern¹⁴⁸ blieb erfolglos (Schema 4-29-II). Es fand keine Umsetzung statt.



Methode	Katalysator	Base	Add.	LM	Temp. [°C]	μW-Energie [W]
I	Pd(PPh ₃) ₄	DBU	-	H ₂ O/EtOH	150	60
II	Pd(PPh ₃) ₄	Cs ₂ CO ₃	-	1,4-Dioxan	115	60
III	Pd(PPh ₃) ₄	Na ₂ CO ₃	-	DME	100	75
IV	Pd(PPh ₃) ₄	Cs ₂ CO ₃	-	DME	100	75
V	Pd(OAc) ₂	Na ₂ CO ₃	TBAB	H ₂ O	150	60

Schema 4-29: Versuche zur Mikrowellen-induzierten Suzuki-Kupplung zur Darstellung von **28e** und **28f**, ausgehend von **28b**

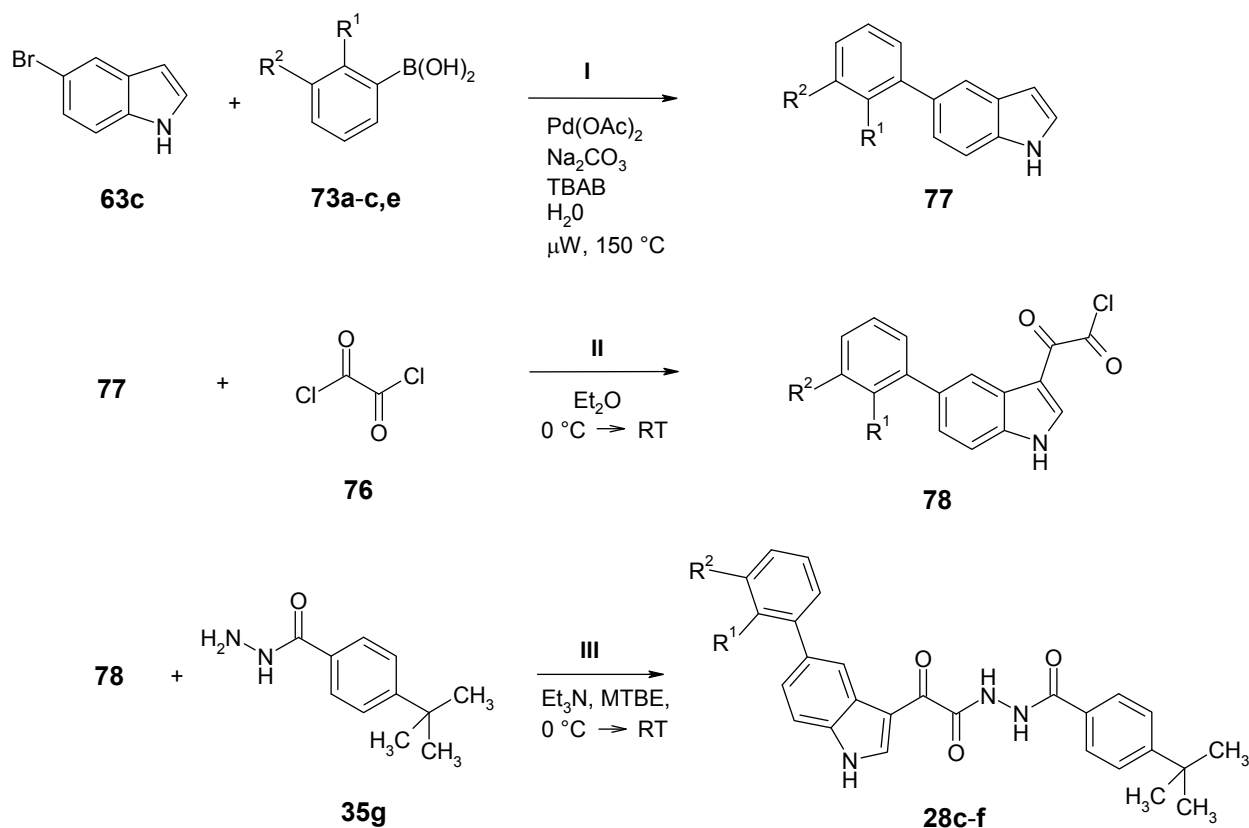
(Add. = Additivum; LM = Lösungsmittel; μW = Mikrowelle; DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; TBAB = Tetrabutylammoniumbromid; DME = Dimethoxyethan)

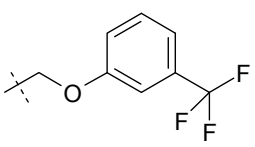
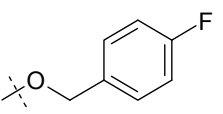
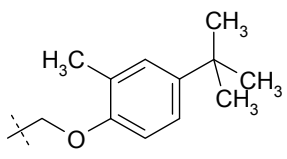
Der in Anlehnung an Miyaura und Suzuki¹¹⁵ sowie D'Angelo und Mitarbeiter¹⁴⁹ unternommene Mikrowellen-induzierte Syntheseversuch mit 5 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und einer wässrigen Lösung von Natriumcarbonat in DME führte nach insgesamt zwanzigminütiger Reaktionszeit lediglich zu einer geringen Umsetzung unter Bildung eines komplexen Produktgemisches (Schema 4-29-III). Ein Austausch der wässrigen Natriumcarbonatlösung gegen Cäsiumcarbonat unter ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen konnte nach einer Reaktionszeit von 20 min die Umsetzungsrate nicht verbessern (Schema 4-29-IV). Auch hier konnte auf dem Dünnschichtchromatogramm nur ein Produktgemisch und das kaum umgesetzte Edukt identifiziert werden.

Ein Verfahren nach Leadbeater und Marco¹⁰⁹, bei dem äquimolare Mengen der Edukte **28b** und **72** in Gegenwart von Palladium(II)acetat, Natriumcarbonat und Tetrabutylammoniumbromid in Wasser in der Mikrowelle umgesetzt wurden, führte ebenfalls zur Bildung eines komplexen Produktgemisches (Schema 4-29-V).

Da die direkte Kupplung der Boronsäuren an **28b** Schwierigkeiten bereitete, wurde die Synthese nun ausgehend von 5-Brom-1*H*-indol (**63c**) durchgeführt. Die Darstellung der gewünschten Endverbindungen **28c-f** sollte nach dem in Schema 4-30 angegebenen Verfahren durchgeführt werden.

Auch hier wurden bei der Suzuki-Kupplung (Schema 4-30-I) verschiedene Reaktionsbedingungen ausprobiert. Das bei den Verbindungen **27l-q** erfolgreich angewandte Mikrowellenverfahren mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) und DBU in einem Wasser-Ethanol-Gemisch führte zwar zu einer auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbaren Umsetzung, jedoch gelang es nicht, ein Produkt zu isolieren. Gleiches gilt für die Anwendung der Vorschrift von Chanthavong und Leadbeater¹¹¹, bei der unter sonst gleichen Bedingungen statt Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) Palladium(II)acetat verwendet wurde.



28	R¹	R²	28	R¹	R²
c	H	H	e		H
d		H	f	H	

Schema 4-30: Synthese der am Indol substituierten Verbindungen **28c-f**

Die Synthese gelang schließlich nach dem schon oben beschriebenen, aber ausgehend von **28b** nicht erfolgreichem Mikrowellen-unterstützten Verfahren nach Leadbeater und Marco.¹⁰⁹ Nach nur fünfminütiger Reaktion mit Palladium(II)acetat, Natriumcarbonat und TBAB in Wasser konnten klebrig-ölige Produkte isoliert werden. Diese mussten

anschließend in einigen Fällen chromatographisch von den zahlreichen Nebenprodukten abgetrennt werden, die sich im Verlauf der Synthese gebildet hatten.

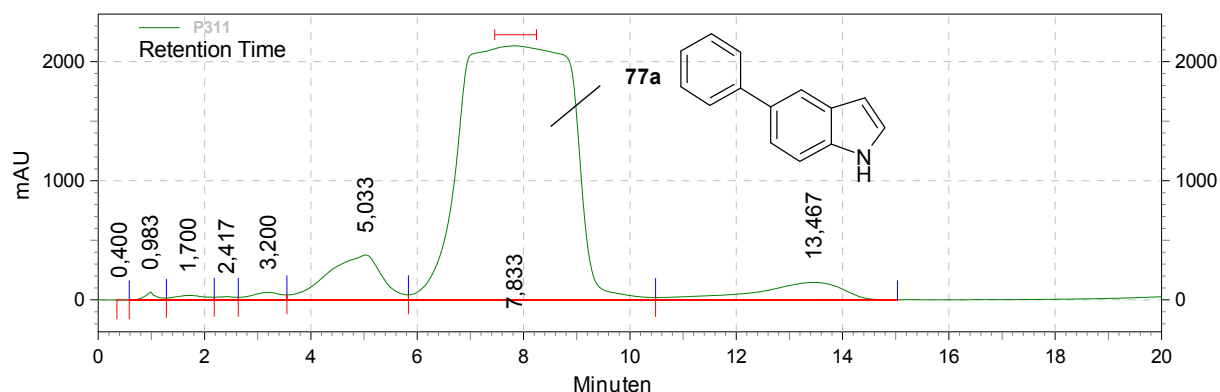


Abbildung 4-11: Chromatogramm der präparativen Aufarbeitung von **77a**

So führte die Synthese von **77a** ($R^1, R^2 = H$) zur Bildung eines Produktgemisches, dessen Bestandteile auf dem Dünnschichtchromatogramm in diversen Fließmitteln sehr eng beieinander lagen, so dass eine Trennung per konventioneller Säulenchromatographie nicht aussichtsreich erschien. Das Chromatogramm der analytischen HPLC-Untersuchung zeigte an einer Umkehrphase (RP-18) einen von den Nebenprodukten deutlich getrennten Hauptpeak, so dass eine Trennung des Gemisches mittels präparativer HPLC durchgeführt wurde (Abbildung 4-11).

Unter Verwendung eines Acetonitril/Wasser-Gemisches als Elutionsmittel konnten drei Fraktionen isoliert werden. Die Aufarbeitung der Hauptfraktion ergab das gewünschte 5-Phenyl-1H-indol (**77a**) in 46% der theoretischen Ausbeute. Die anschließende Reaktion mit Oxalylchlorid (**76**) führte zu den 2-(5-Aryl-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetylchloriden **78**, die mit 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (**35g**) zu den Zielverbindungen **28c-f** umgesetzt werden konnten (Schema 4-30-II und 4-30-III).

4.12.3 Strukturaufklärung von **28f** mittels 2D-NMR-Spektroskopie

Aufgrund der zunehmenden Komplexität der Verbindungen wurden zur Strukturaufklärung von einigen Vertretern zusätzlich zweidimensionale NMR-Spektren angefertigt. Das zweidimensionale homonuklear (H,H)-korrelierte NMR-Experiment (COSY: *correlated spectroscopy*) liefert NMR-Spektren, bei denen auf zwei rechtwinklig zueinander angeordneten Frequenzachsen die chemischen Verschiebungen von Protonen korreliert sind. Man erhält auf diese Weise Informationen über die Nachbarschaft aller koppelnden Kerne über zwei und drei, eventuell sogar über vier Bindungen. Somit ist eine genaue Zuordnung der Signale zu einzelnen Protonen möglich, was besonders bei diesen komplexen Strukturen von Interesse ist.

In den Abbildungen 4-12 und 4-13 ist ein Ausschnitt bzw. eine Ausschnittsvergrößerung des H,H-COSY-Spektrums von **28f** zu sehen. Die Diagonale zeigt das Normalspektrum in Aufsicht. Diese Peaks werden als Diagonalpeaks bezeichnet. Durch Kreuz- oder Korrelationspeaks werden die Kopplungen zwischen den Protonen sichtbar.

Ein eindeutiges Signalmuster zeigen die koppelnden Kerne H_A-3, H_A-5 und H_A-6. H_A-5 spaltet in ein Dublett vom Dublett auf. Es zeigt eine große Kopplungskonstante von 8.5 Hz, welche der Kopplung zum benachbarten, als Dublett aufspaltenden Proton H_A-6 entspricht und eine kleine Kopplungskonstante von 2.1 Hz, die die Kopplung zum Proton H_A-3 repräsentiert, dessen Signal ebenfalls als Dublett vorliegt.

Das Proton H_C-6 des Indols spaltet in ein Dublett vom Dublett auf ($J = 1.8$ Hz und 8.4 Hz). Es koppelt mit den Protonen H_C-4 ($J = 1.4$ Hz) und H_C-7 ($J = 8.5$ Hz), zwischen denen wiederum keine Kopplung zu erkennen ist. Sie liegen als Dublett vor (Kopplung zwischen H_C-6 und H_C-7 siehe Ausschnittsvergrößerung in Abbildung 4-13). Die unter 4.11.2 angesprochene Kopplung zwischen dem Proton des Indol-Stickstoffs und H_C-2 ist in diesem Fall nicht zu sehen. Die Signale dieser Protonen treten als Singulett auf (im Ausschnitt ist nur H_C-2 zu sehen).

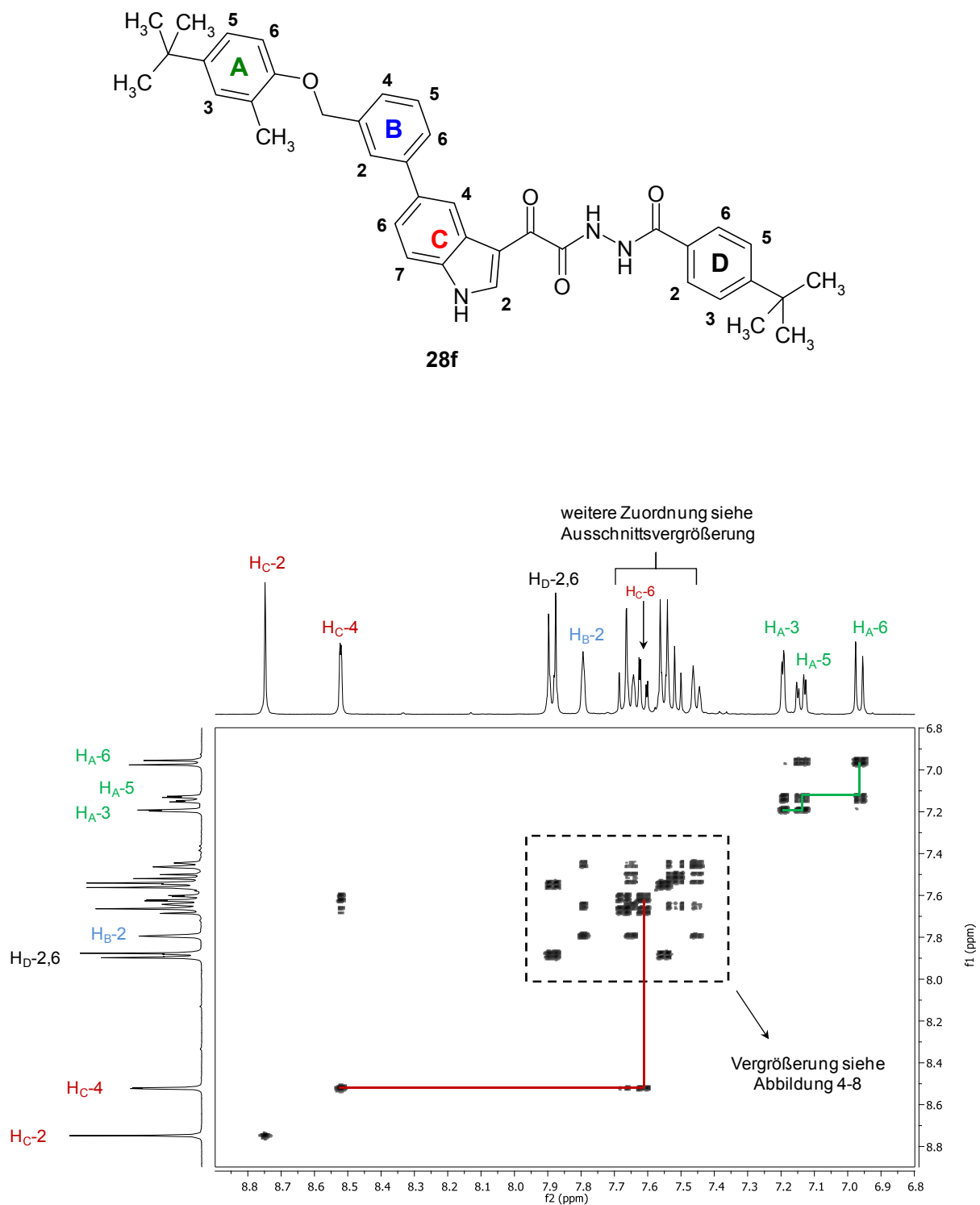


Abbildung 4-12: Ausschnitt des H,H-COSY-Spektrums von **28f**

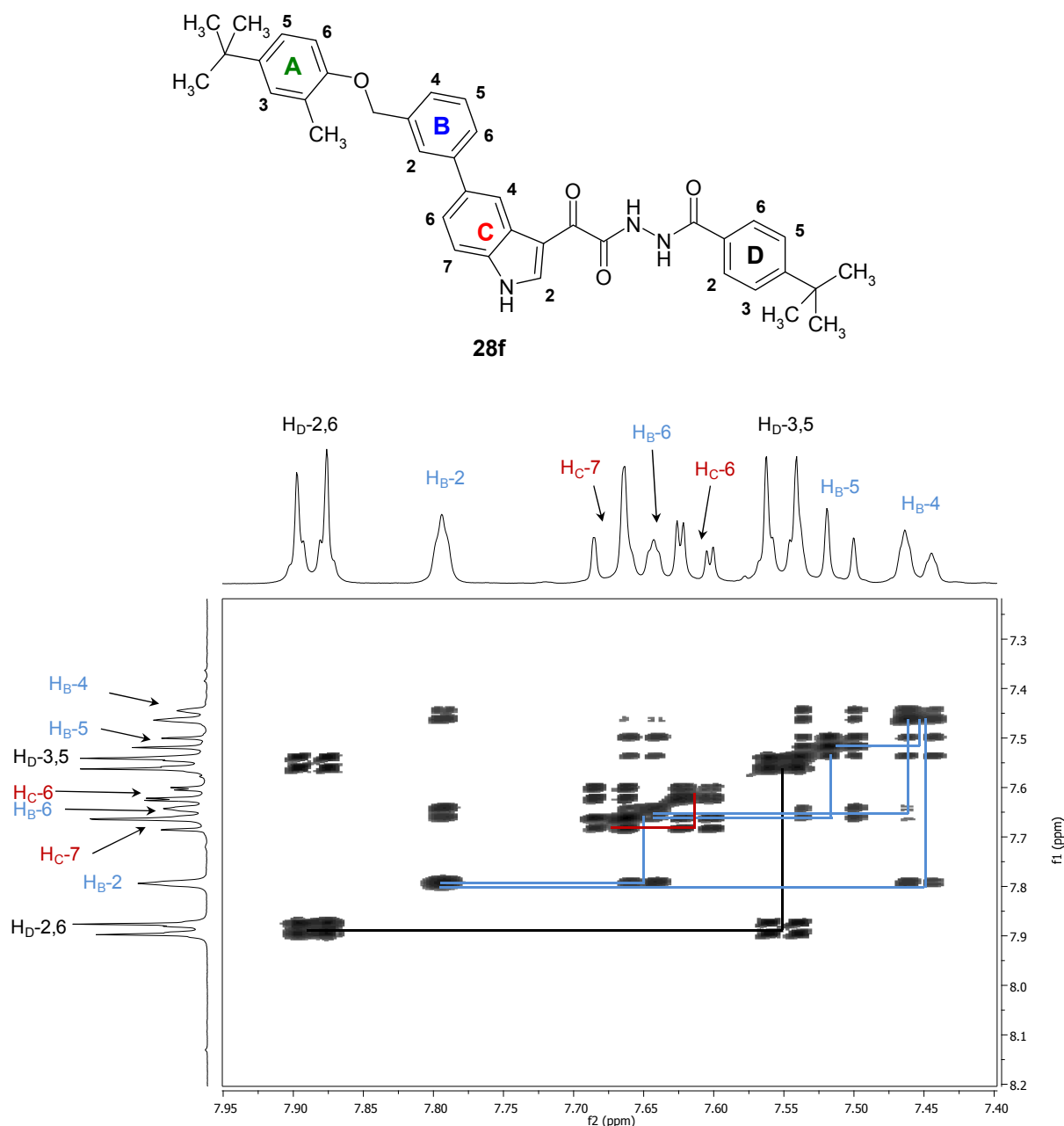


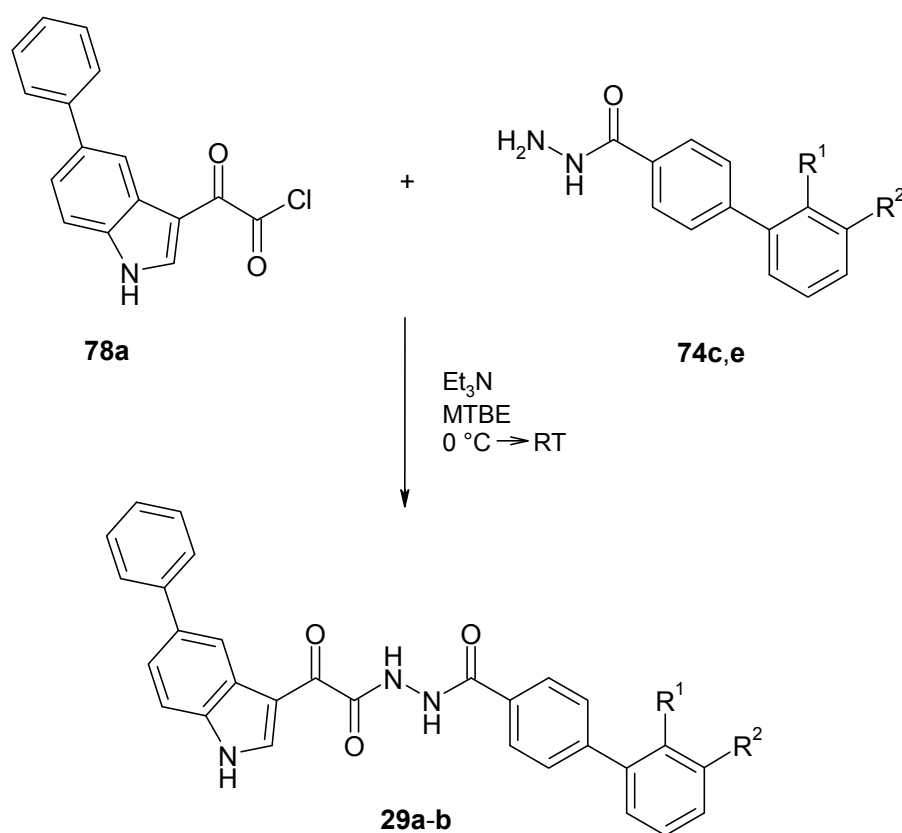
Abbildung 4-13: Ausschnittsvergrößerung des H,H-COSY-Spektrums von **28f**

Das Proton H_B-2 koppelt mit den Protonen H_B-4 und H_B-6. Das Signal spaltet jedoch nicht hinreichend auf, es kann somit nur als Multiplett tituiert werden. Die Protonen H_B-4, H_B-5 sowie H_B-6 zeigen gemeinsame Kreuzpeaks, allerdings ist die Auflösung der Signale zu gering, um das genaue Aufspaltungsmuster und entsprechende Kopplungskonstanten zu ermitteln. Des Weiteren ist eine Kopplung zwischen den Protonen H_D-2 bzw. H_D-6 und H_D-3 bzw. H_D-5 zu erkennen, deren Signale in das für 1,4-substituierte Aromaten typische Muster aufspalten.

4.13 Synthese der *N'*-(4-Phenylbenzoyl)-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **29a** und **29b**

Als Vertreter für Verbindungen, die im Vergleich zu Grundstruktur **10** sowohl am Phenylring als auch am Indol mit aromatischen Resten substituiert sind, sollten die Strukturen **29a** und **29b** synthetisiert werden.

Die Reaktion von **78a** mit **74c** bzw. **74e** in Gegenwart von Triethylamin in MTBE ergab die gewünschten Zielstrukturen in mittleren Ausbeuten.



29	R ¹	R ²
a		H
b	H	

Schema 4-31: Synthese der *N'*-(4-Phenylbenzoyl)-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **29a** und **29b**

5 Biologische Aktivität

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen sowie die kommerziell erworbenen Substanzen wurden auf ihre Proteinkinase-inhibitorische Aktivität getestet. Ausgewählte Verbindungen wurden zudem zur Bestimmung ihrer antiproliferativen Aktivität einem Zelllinienassay unterzogen. Die Ergebnisse dieser Testungen sind nach Verbindungsklassen geordnet aufgeführt. Auf Basis dieser Daten werden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen diskutiert. Darüber hinaus wurden Docking-Studien durchgeführt, um erste Hinweise auf einen potentiellen Bindungsmodus der Substanzen in den Proteinkinasen zu erlangen.

5.1 Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivitäten

Die Bestimmung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität erfolgte durch die Firma ProQinase GmbH, Freiburg. Dazu wurden zunächst in einem *in vitro* Proteinkinase-Assay die IC₅₀-Profile gegenüber 8 bzw. 15 tumorrelevanten Proteinkinasen sowie der physiologisch essentiellen Insulin-Rezeptor-Kinase (IR) generiert. Eine Hemmung der Letzteren ist nicht erwünscht, da bei einem denkbaren Einsatz der Verbindungen als Tumortheraeutika Nebenwirkungen zu erwarten wären. Neben den Untersuchungen am isolierten Enzym erfolgte zudem bei ausgewählten Verbindungen eine Bestimmung der zellulären Aktivität.

Der IC₅₀-Wert entspricht derjenigen Konzentration einer Substanz, bei der die Aktivität eines Enzyms um 50% gehemmt wird. Die IC₅₀-Werte sämtlicher Verbindungen sowie die genaue Durchführung der Assays sind in Kapitel 8.3 aufgeführt.

Zugunsten eines übersichtlichen Vergleichs wird die inhibitorische Aktivität im Folgenden mitunter in Form von pIC₅₀-Werten angegeben. Dabei handelt es sich um den negativen dekadischen Logarithmus der IC₅₀-Werte. Höhere Balken in den Säulendiagrammen repräsentieren somit Verbindungen mit höherer inhibitorischer Aktivität.

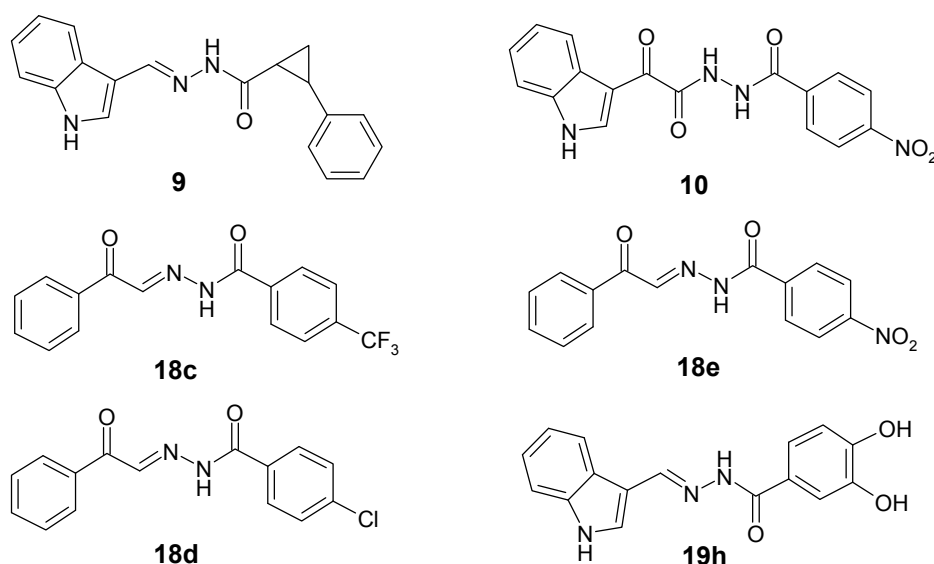
Die Bestimmung der antiproliferativen Aktivität erfolgte im Rahmen eines *in vitro* Zelllinienassays am *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA). Nähere Erläuterungen dazu sind unter Abschnitt 5.4.3 sowie in Kapitel 8.3.3 aufgeführt.

5.2 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Verbindungsklassen 15-19

Die inhibitorische Aktivität der Verbindungsklassen **15-19** wurde an 8 tumorrelevanten Proteinkinasen bestimmt (Tabelle 5-1).

Von den insgesamt 34 getesteten Verbindungen zeigten lediglich die Verbindungen **18c**, **18d**, **18e** und **19h** eine inhibitorische Aktivität gegenüber c-MET mit IC₅₀-Werten unter 100 µM. Im Vergleich zu den Ausgangsstrukturen **9** und **10** konnte insgesamt nur eine geringfügige Verbesserung des IC₅₀-Werts in Bezug auf die c-MET Kinase erreicht werden. Zudem ist die Hemmung nicht selektiv. Andere Proteinkinasen des Assays wurden zum Teil mit niedrigeren IC₅₀-Werten gehemmt.

Tabelle 5-1: IC₅₀-Werte [µM] der aktivsten Vertreter der Verbindungsklassen **15-19** im Vergleich zu den Ausgangsstrukturen **9** und **10**



	Aurora-B	B-RAF-VE	CK2-α1	MET	EGFR	FAK	IGF-1R	VEGFR-2
9	38		66		40			
10	15	61		70	21			
18c	50	33		46	72	70	61	16
18d	51	50		56	17		18	28
18e	72	44		42	n.b.	68	17	27
19h	74	53		76	18	67		68

Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 µM; n.b.: nicht bestimmt

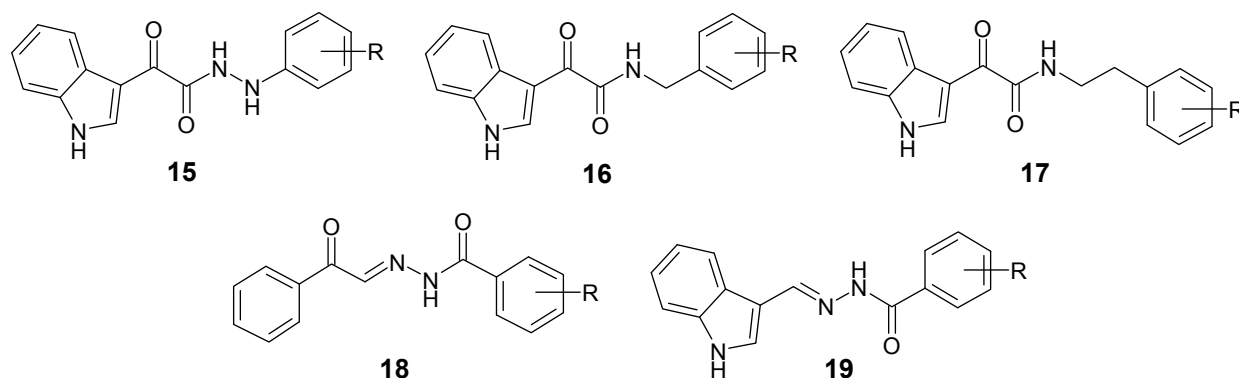


Abbildung 5-1: Allgemeine Struktur der dargestellten Verbindungen **15-19**

Die in den Ausgangsverbindungen **9** und **10** enthaltenen zentralen Strukturelemente wurden bei den Verbindungen **15-19** systematisch verändert (Abbildung 5-1). Eine Ableitung konkreter Struktur-Aktivitäts-Beziehungen auf Basis der hier ermittelten Ergebnisse der biologischen Testung war jedoch nicht möglich. Generell scheinen sich große, voluminöse bzw. lipophile Substituenten am Phenylring günstig auf die inhibitorische Aktivität auszuwirken. Ein Fitting der aktivsten Vertreter und der Grundstrukturen erlaubte zudem die Ableitung eines hypothetischen Pharmakophors **20** (Abbildung 5-2).

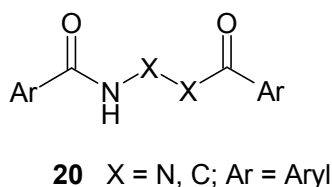


Abbildung 5-2: Hypothetisches Pharmakophor **20**

Die fehlende Selektivität gegenüber c-MET könnte auf der ausgeprägten konformativen Beweglichkeit innerhalb der Moleküle beruhen, die eine flexible Anpassung der Strukturen innerhalb der Bindungsstellen der Proteinkinasen ermöglicht. Gegen diese Vermutung sprechen allerdings die Ergebnisse der ursprünglichen Testung der Ausgangsverbindungen **9** und **10**, die trotz der flexiblen Molekülstrukturen eine Selektivität gegenüber c-MET gezeigt hatten.

5.3 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Verbindungsklassen 21-26

Die Verbindungen **21-26** wurden mit dem Ziel synthetisiert, durch eine Arretierung bzw. Cyclisierung des hypothetischen Pharmakophors die konformative Beweglichkeit im Molekül einzuschränken und dadurch die Selektivität und die Aktivität gegenüber der c-MET Kinase zu erhöhen.

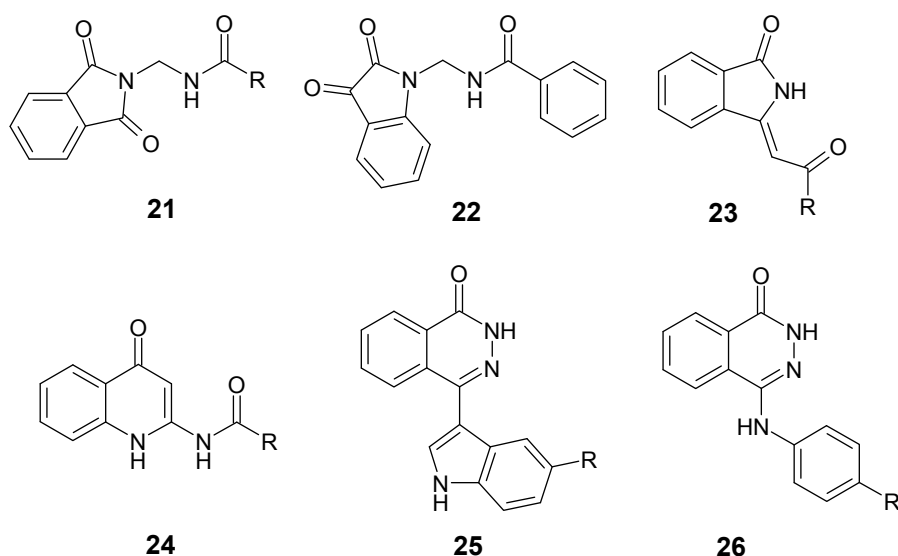


Abbildung 5-3: Allgemeine Struktur der Verbindungen **21-26**

Insgesamt wurden 17 Verbindungen an 8 bzw. 16 Proteinkinasen getestet. Mit Ausnahme von **23a** zeigte kein einziger Vertreter dieser cyclischen Verbindungen eine Aktivität gegenüber c-MET oder den anderen Kinasen des Assays. **23a** ist mit einem IC_{50} -Wert von 49 μ M gegenüber c-MET nur schwach aktiv. Gegenüber 6 weiteren Kinasen wurden für **23a** IC_{50} -Werte in einem Bereich von 11 μ M bis 73 μ M ermittelt.

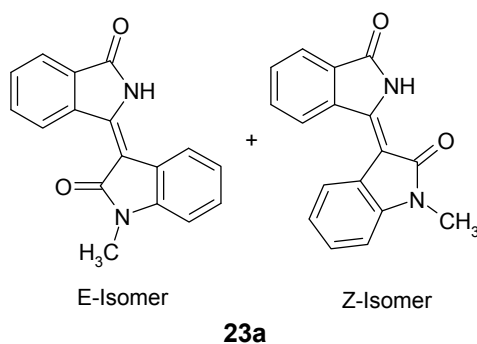


Abbildung 5-4: Verbindung **23a**

Die angestrebte Verbesserung von Aktivität sowie Selektivität gegenüber c-MET durch Cyclisierung des hypothetischen Pharmakophors **20** ist nicht gelungen. Grundsätzlich scheinen die unbeweglichen, starren Moleküle nicht gut mit den potentiellen Bindungsstellen der Kinasen interagieren zu können, da gegenüber keiner einzigen Kinase eine nennenswerte Inhibition festgestellt werden konnte.

Das in der Grundstruktur **10** enthaltene zentrale Strukturmotiv scheint für eine inhibitorische Aktivität der Verbindungen essentiell zu sein. Zwar zeigten auch die an Grundstruktur **9** angelehnten *N'*-(2-Oxo-2-phenylethyliden)benzhydrazide **18** eine gewisse inhibitorische Aktivität, da diese Grundstruktur jedoch schon häufiger in der Literatur beschrieben wurde, sollte der Fokus auf neuartige *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide gerichtet werden.

5.3.1 Molecular Modelling

5.3.1.1 Allgemeine Anmerkungen zu den durchgeführten Docking-Experimenten

Bei allen im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Docking-Experimenten wurde auf in der PDB-Datenbank veröffentlichte Kristallstrukturen zurückgegriffen. Die Auswahl der Kristallstruktur hat entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der Docking-Experimente. Verschiedene Faktoren spielen dabei eine Rolle: Liegt eine aktive oder inaktive Konformation der Kinase vor und welche soll inhibiert werden? Wodurch wurde der entsprechende Aktivitätsgrad verursacht: Ist die Kinase phosphoryliert, wurden Mutationen eingebracht, liegt eine DFG-in- oder -out-Konformation vor? Ist ein Ligand gebunden? Hat dieser die Konformation der Kinase grundlegend verändert? Wie ist die Kristallstruktur aufgelöst? Bestehen Lücken in der Aminosäuresequenz in für die Bindung des Liganden relevanten Bereichen? Die Problematik bei der Auswahl einer entsprechenden Kristallstruktur wird im folgenden Abschnitt am Beispiel des Dockings der cyclisierten Verbindungen **21-26** in c-MET genauer verdeutlicht.

Weiterhin soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass Docking-Experimente lediglich erste Hinweise auf potentielle Bindungsmodi der Substanzen in den Kinasen geben. Zudem erfolgte das Docking unter der Annahme, dass es sich bei den Verbindungen um ATP-kompetitive Inhibitoren handelt, die mit den ATP-Bindetaschen der Proteinkinasen interagieren. Um fundiertere Aussagen über die Wechselwirkung

zwischen Inhibitor und Enzym machen zu können, sind neben der Strukturanalyse von Kokristallisaten auch enzymkinetische Untersuchungen unabdingbar.

5.3.1.2 Anmerkungen zur Auswahl der c-MET-Kristallstruktur

Zur Ermittlung potentieller Wechselwirkungen der cyclisierten Verbindungen **21-26** mit der ATP-Bindetasche der c-MET Kinase wurden Docking-Experimente durchgeführt. Dazu musste zunächst die Auswahl einer geeigneten Kristallstruktur erfolgen.

Zu diesem Zeitpunkt standen fünf Röntgenkristallstrukturen der c-MET Kinase für das Docking zur Verfügung: 1r0p⁷⁴, 1r1w⁷⁴, 2rfs¹⁵⁰, 2rfn¹⁵⁰ und 2g15¹⁵¹ (Stand: Februar 2008). 1r1w schied als Grundlage für das Docking aus, da die Bindetasche komplett vom *A-loop* verdeckt wird. Obwohl es sich bei all diesen Strukturen ausschließlich um c-MET Kinasen mit einer DFG-in/ α C-out-Konformation handelt, offenbarte ein Vergleich der verbleibenden vier Kristallstrukturen besonders im Bereich der Bindetasche unterschiedliche Konformationen im Verlauf des *backbones* und in den Seitenketten. 1r0p und 2rfs weisen starke Unterschiede in der Ausrichtung der Aminosäuren Met1229 und Tyr1230 im *A-loop* auf. Eine Überlagerung von 2g15 (kein Ligand) und 2rfs (Ligand: AM8) zeigt zudem eindrucksvoll, dass es bei Bindung eines Liganden zu ausgeprägten Konformationsänderungen kommen kann (Abbildung 5-5). Mit Ausnahme weniger Lücken in der Aminosäuresequenz zeigen 2g15 und 2rfs eine identische Primärstruktur. Im Bereich des *A-loops* (Met1229 und Tyr1230) offenbart sich jedoch eine tiefgreifende Umstrukturierung. In der Struktur 2g15 ragt insbesondere Met1229 zunächst in die Bindetasche herein. Die Bindung des Liganden führt zu einer Orientierung von Met1229 nach außen und von Tyr1230 nach innen, so dass ein π -stacking zwischen dem Phenylring des Tyrosins und dem Phenylring des Liganden möglich wird. Eine weitere Umorientierung tritt im Bereich Arg1086 bis Phe1089 (Bestandteil des *G-loops*) auf. Der Phenylring des Phe1089 blockiert zunächst die Bindetasche, wird dann aber durch den Liganden zusammen mit His1088, Gly1087 und Arg1086 nach außen verlagert.

Unterschiedliche Konformationen innerhalb der ATP-Bindetasche, die hier beispielhaft dargestellt sind, können zu sehr differierenden Docking-Lösungen führen, die in Abhängigkeit von der verwendeten Kristallstruktur einer kritischen Betrachtung unterzogen werden sollten.

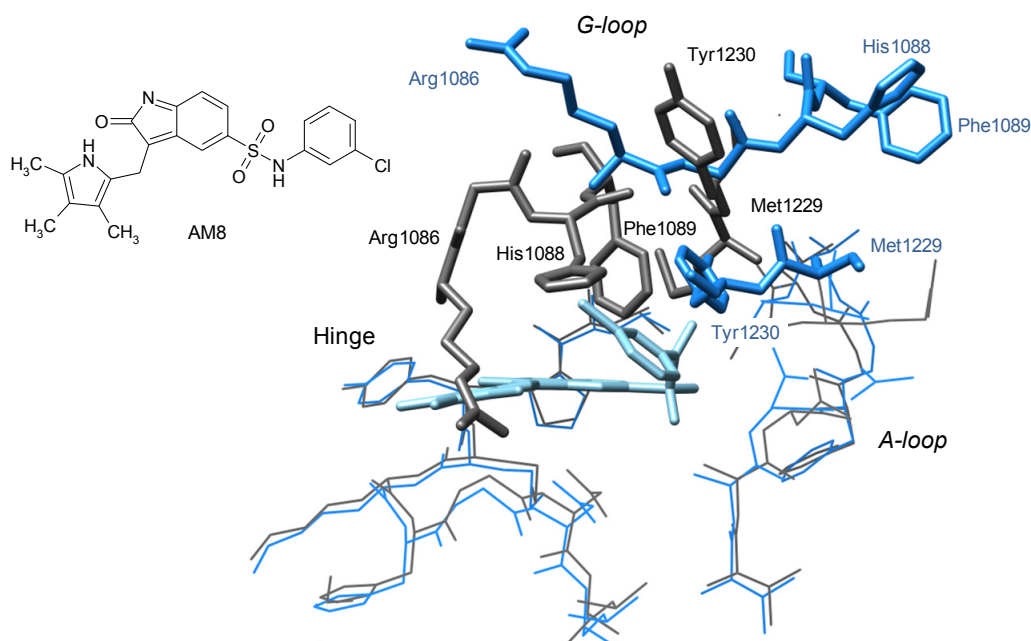


Abbildung 5-5: Vergleich der ATP-Bindetaschen der c-MET Kristallstrukturen 2g15 und 2rfs

(2g15: grau; 2rfs: blau, mit Inhibitor (cyan); Es handelt sich in beiden Fällen um inaktive Konformationen von c-MET (DFG-in/ α C-out); Visualisierung mit Chimera.¹²⁾

5.3.1.3 Docking-Studie mit c-MET*

Die obigen Ausführungen zeigen, dass die Identifizierung einer 'allround'-Bindetasche von c-MET nicht möglich ist. Deswegen erfolgte zunächst basierend auf den C_{α} -Atomen nach Entfernung der Inhibitoren eine Überlagerung der Kristallstrukturen 1r0p, 2rfn und 2rfs. Aufgrund der Ergebnisse von Re- und Crossdocking war es nicht möglich, sich auf eine universal brauchbare Röntgenkristallstruktur festzulegen. Das Docking wurde deswegen sowohl mit 1r0p als auch 2rfs durchgeführt. Die Docking-Lösungen der verschiedenen Strukturklassen **21-26** zeigten zwar mitunter Wasserstoffbrücken zu Met1160 und Pro1158 in der Hinge-Region, diese erfolgten aber unsystematisch, so dass sich kein gemeinsames Bindungsmotiv für diese Gruppe von Substanzen definieren ließ.

Die Ergebnisse aus den Docking-Studien bestätigen unter der Annahme, dass die Verbindungen mit der ATP-Bindetasche interagieren, die Resultate des Enzymassays.

* Die Docking-Untersuchungen wurden von Dr. Thomas Lemcke (Universität Hamburg) durchgeführt.

5.4 Biologische Aktivität der Verbindungsklassen 27-29

5.4.1 Proteinkinase-inhibitorische Aktivität

Die Verbindungsklassen **27**, **28** und **29** wurden zunächst an 15 isolierten, tumorrelevanten Proteinkinasen sowie dem Insulin-Rezeptor getestet. Der Übersichtlichkeit halber werden im Folgenden neben c-MET und IR jedoch nur die Kinasen aufgeführt, an denen eine nennenswerte inhibitorische Aktivität der Verbindungen festgestellt werden konnte. Hierbei handelt es sich um IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B. Einzelheiten zu Funktion und Bedeutung dieser Kinasen sind bereits in Kapitel 2.3 aufgeführt.

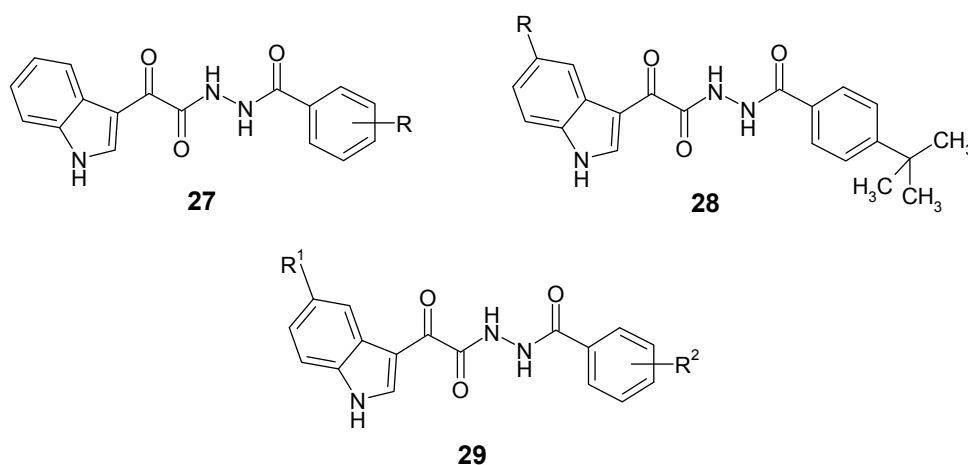


Abbildung 5-6: Allgemeine Struktur der Verbindungsklassen **27**, **28** und **29**

Abbildung 5-7 zeigt die pIC₅₀-Werte der Verbindungen **27** sowie der Grundstruktur **10**. Einige Derivate der Verbindungsklasse **27** zeigten gegenüber c-MET im Vergleich zu Grundstruktur **10** eine etwas verbesserte inhibitorische Aktivität. Der aktivste Vertreter ist **27o** mit einem IC₅₀-Wert von 4.1 µM. Insgesamt ist der Grad der Verbesserung der inhibitorischen Aktivität gegenüber c-MET jedoch nicht zufriedenstellend, zumal in der gleichen Größenordnung eine Hemmung des IR festzustellen ist.

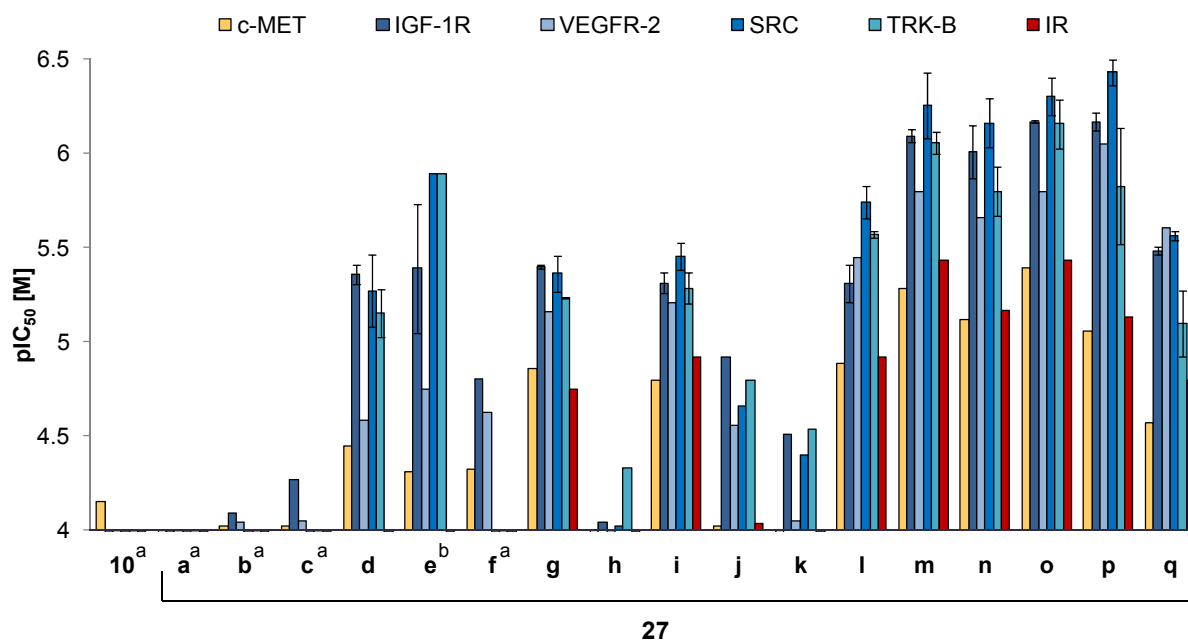


Abbildung 5-7: Inhibitionsprofil der Verbindungen **10** und **27a-q**

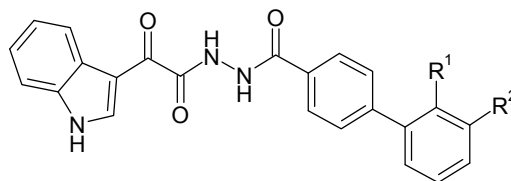
(Fehlende Balken stehen für einen pIC₅₀-Wert ≤ 4.0. a) Die inhibitorische Aktivität gegenüber SRC, TRK-B und IR wurde nicht ermittelt. b) Die inhibitorische Aktivität gegenüber IR wurde nicht ermittelt.

Einige pIC₅₀-Werte basieren auf zwei voneinander unabhängigen IC₅₀-Bestimmungen. In diesen Fällen ist zusätzlich die Spannweite der beiden Messwerte angegeben.)

Bemerkenswert ist die deutlich gesteigerte, zum Teil submikromolare Aktivität der Verbindungen **27** gegenüber den Kinasen IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B. Diese Kinasen waren zu Beginn des Projekts nicht von Interesse. Bei der ursprünglichen Testung wurden IGF-1R und VEGFR-2 nicht inhibiert (die inhibitorische Aktivität gegenüber SRC und TRK-B wurde hierbei nicht ermittelt). Die inhibitorische Aktivität an IGF-1R und VEGFR-2 konnte um mehr als zwei Größenordnungen gegenüber den Ausgangsverbindungen **9** und **10** verbessert werden. Die aktivsten Vertreter sind **27m**, **o** und **p** (Tabelle 5-2).

Das Vielversprechende an diesem Inhibitionsprofil ist die biochemische Verknüpfung der inhibierten Kinasen innerhalb der Signalkaskaden, so dass hier der in Kapitel 2.4.4 angesprochene Ansatz einer gezielten, gleichzeitigen Hemmung relevanter Kinasen zutreffend ist.

Tabelle 5-2: Verbindungen **27l-q** sowie IC₅₀-Werte [μM] der aktivsten Vertreter **27m**, **o** und **p**



27	R ¹	R ²	27	R ¹	R ²
l		H	o	H	
m		H	p	H	
n	H		q	H	

	c-MET	IGF-1R ^a	VEGFR-2	SRC ^a	TRK-B ^a	IR
27m	5.2	0.75/0.87	1.6	0.85/0.38	0.76/1.0	3.7
27o	4.1	0.68/0.65	1.6	0.63/0.40	0.49/0.90	3.7
27p	8.8	0.75/0.61	0.89	0.44/0.32	2.4/0.58	7.4

^a Die beiden aufgeführten IC₅₀-Werte wurden in zwei voneinander unabhängigen Bestimmungen ermittelt.

Die Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bezieht sich im Folgenden ausschließlich auf die Veränderung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen gegenüber den Kinasen IGF-1R, VEGFR-2, SRC, TRK-B und IR.

Die Grundstruktur **10** trägt eine Nitrogruppe in Position 4 des Phenylrings. Das Fehlen dieses Substituenten (**27a**) führte zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität. Der Ersatz der Nitrogruppe durch eine Methyl- bzw. Methoxygruppe (**27b**, **c**) hatte keinen Einfluss auf die Aktivität. Die Einführung eines großen, lipophilen Restes in Form einer *tert*-Butyl- bzw. Trifluormethylgruppe führte wiederum zu einer deutlichen Steigerung

der Aktivität mit IC_{50} -Werten bis in den einstelligen mikromolaren Bereich (**27d, e**). Positiv anzumerken ist zudem, dass **27d** keine Aktivität gegenüber IR zeigte. Das Selektivitätsverhältnis zwischen IR und dem hochhomologen IGF-1R beträgt 370 (IC_{50} IR/ IC_{50} IGF-1R).

Verbindungen mit Halogensubstituenten in Position 4 des Phenylrings zeigten ebenfalls eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität. Diese Steigerung war bei Einführung eines voluminösen Iodsubstituenten (**27g**) noch deutlich stärker ausgeprägt als bei der 4-Chlorverbindung (**27f**). **27g** zeigte zwar eine mit **27d** vergleichbare inhibitorische Aktivität gegenüber IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B, darüber hinaus kam es jedoch auch zu einer Hemmung des IR. Im Gegensatz zu den in Position 4 substituierten Verbindungen führte ein Halogensubstituent in Position 2 (**27h**) zu einer deutlichen Abnahme der inhibitorischen Aktivität.

Auch die direkte Verknüpfung mit 2,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol in Position 4 des Phenylrings (**27i**) sorgte für eine gesteigerte Hemmwirkung. Mit IC_{50} -Werten zwischen 3.6 μ M und 6.2 μ M lag die Verbindung etwa in der gleichen Größenordnung wie die *tert*-Butyl-substituierte Verbindung **27d**. Das Selektivitätsverhältnis bezüglich des IR war in diesem Fall jedoch schlechter. Im Vergleich zu **27i** führte die Substitution mit 5-Methyl-1,2,4-oxadiazol (**27j**) an gleicher Stelle zu einer deutlichen Abnahme der inhibitorischen Aktivität. Gleiches gilt, wenn die Verknüpfung mit einem Heteroaromaten über eine Etherbrücke (**27k**) erfolgte. Die Ableitung eindeutiger Struktur-Aktivitäts-Beziehungen fällt in diesem Fall schwer. Die zum Teil stark differierenden IC_{50} -Werte könnten auf die unterschiedlichen Positionen der Methylgruppen an den Heteroaromaten oder aber auf die Art und Anzahl der Heteroatome sowie die Ringgröße der Heteroaromaten zurückzuführen sein.

An dieser Stelle lässt sich bereits festhalten, dass sich die direkte Verknüpfung mit großen, lipophilen Substituenten in Position 4 günstig auf die inhibitorische Aktivität der Verbindungen auswirkte. Dieser Effekt wurde mit zunehmender Komplexität der eingeführten Substituenten noch deutlicher. Die Verbindungen mit Biphenyl-Bausteinen (**27l-27q**; Tabelle 5-2) zeigten allesamt eine verbesserte inhibitorische Aktivität im Vergleich zu **27d**. Die Position der Substituenten an dieser Biphenylstruktur hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität. Zwischen den 2'- und 3'-substituierten Strukturen bestand kein nennenswerter Unterschied in der Hemmwirkung. Die Art der

Substituenten hatte wiederum Einfluss. So zeigten die Verbindungen **27m**, **27o** und **27p** mit raumfüllenden, durchweg unpolaren Substituenten im Gegensatz zu der vergleichsweise polaren Sulfonamidstruktur **27q** Aktivitäten im submikromolaren Bereich.

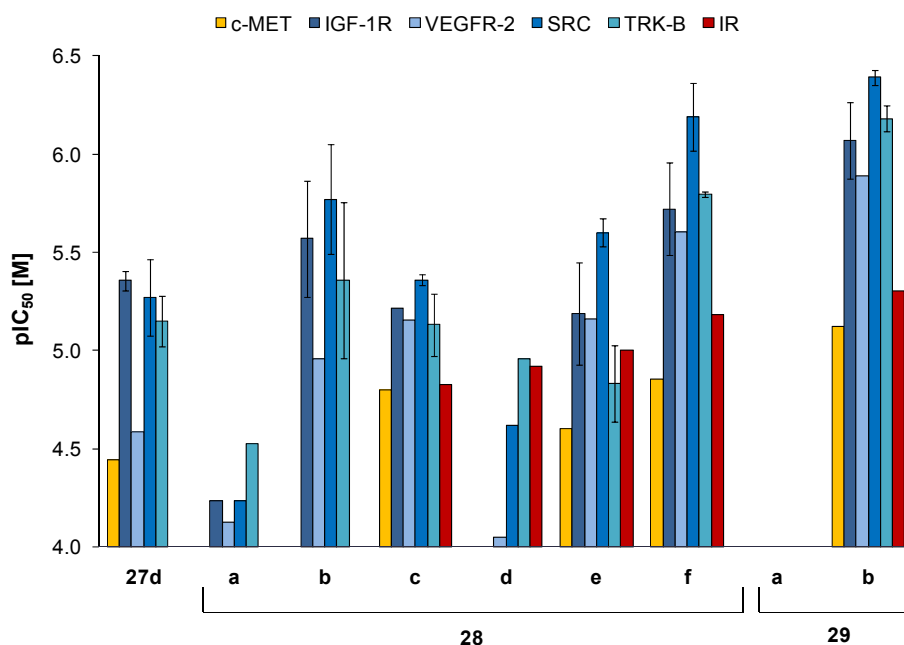


Abbildung 5-8: Inhibitionsprofil der Verbindungen **28a-f** und **29a-b**

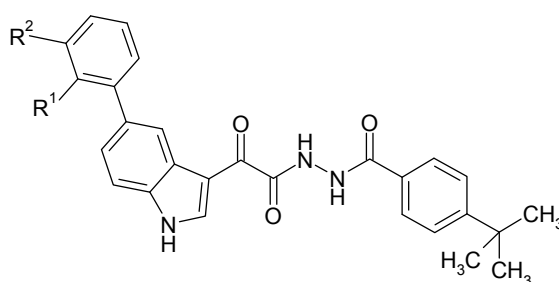
(Fehlende Balken stehen für pIC_{50} -Werte ≤ 4.0 . Einige pIC_{50} -Werte basieren auf zwei voneinander unabhängigen IC_{50} -Bestimmungen. In diesen Fällen ist zusätzlich die Spannweite der beiden Messwerte angegeben.)

Ausgehend von Verbindung **27d** wurden bei den Verbindungen **28** Substitutionen in Position 5 des Indols vorgenommen. Die pIC_{50} -Werte dieser Verbindungen sind in Abbildung 5-8 dargestellt. Die Einführung einer Methoxygruppe (**28a**) führte zu einer deutlichen Abnahme der inhibitorischen Aktivität. Die Brom-substituierte Verbindung **28b** zeigte wiederum eine leicht erhöhte inhibitorische Aktivität gegenüber IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B, während keine Hemmung des IR auftrat. Ein elektronenziehender Substituent wirkte sich somit günstig auf die Aktivität gegenüber den oben genannten Kinasen und das Selektivitätsverhältnis bezüglich des IR aus.

Im Gegensatz zu den Verbindungen **27** führte die Substitution mit komplexen aromatischen Resten bei den Verbindungen **28** zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (zugehörige Strukturen siehe Tabelle 5-3). Erwähnenswert ist die deutlich verminderte bzw.

fehlende Aktivität von **28d** gegenüber IGF-1R und VEGFR-2 bei gleichzeitig deutlich gesteigerter Aktivität gegenüber IR. Generell scheint sich hier eine Substitution in Position 2 des an das Indol angehängten Phenylrings ungünstig auf das Selektivitätsverhältnis zum IR auszuwirken (**28d, e**). Besonders deutlich wird dies im Vergleich zu IGF-1R. Ein Substituent in Position 3 des Phenylrings (**28f**) führte hingegen abermals zu einer stärkeren Hemmung der gewünschten Kinasen und einer weniger stark erhöhten inhibitorischen Aktivität am IR. Hier scheinen, unter der Annahme eines ATP-kompetitiven Bindungsmodus der Substanzen, deutliche Unterschiede bezüglich der Orientierungsmöglichkeiten innerhalb der ATP-Bindetasche zu bestehen.

Tabelle 5-3: Verbindungen **28c-f**

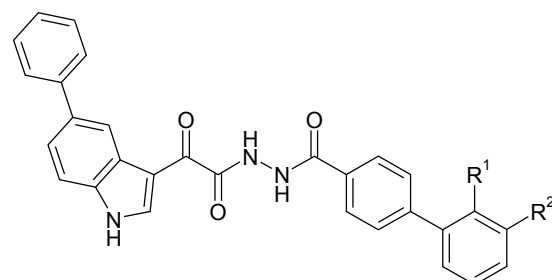
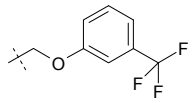
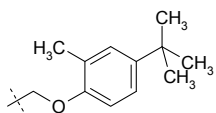


28	R ¹	R ²	28	R ¹	R ²
c	H	H	e		H
d		H	f	H	

Die Kombination der Substitutionen aus den Verbindungen **27m, o** und **28c** führte zu den Strukturen **29a** und **29b** (Tabelle 5-4). Während **29b** eine in etwa vergleichbare inhibitorische Aktivität zeigte wie das am Indol nicht substituierte Analogon **27o**, wurde bei **29a** die Einführung eines Phenylsubstituenten am Indol im Vergleich zu **27m** nicht toleriert (Abbildung 5-8). Es kam zu einem kompletten Aktivitätsverlust. Im Gegensatz zu den Verbindungen **27** scheint nun die Position des Phenoxyethylsubstituenten

Einfluss auf die Aktivität gegenüber den Kinasen zu haben. Dies könnte der zunehmenden Komplexität der Verbindungen geschuldet sein, aus der in Abhängigkeit der Position des Phenoxymethylsubstituenten unterschiedliche Ausrichtungsmöglichkeiten innerhalb der ATP-Bindetasche resultieren.

Tabelle 5-4: Verbindungen **29a** und **29b**

		
29	R¹	R²
a		H
b	H	

5.4.2 Zelluläre Aktivität ausgewählter Verbindungen

Die Verbindungen **27-29** zeigten im *in vitro* Proteinkinase-Assay gegenüber SRC die höchsten inhibitorischen Aktivitäten. Als aktivste Vertreter wurden deswegen **27m**, **27o** und **27p** zusätzlich einem SRC-spezifischen zellulären Phosphorylierungsassay unterzogen. Hierbei wurden SRC-exprimierende Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Verbindungen behandelt, mit dem Ziel, zelluläre IC₅₀-Werte zu generieren. Als Referenz diente der etablierte Multikinase-Inhibitor Dasatinib. Keine der getesteten Verbindungen zeigte eine signifikante zelluläre Aktivität.

5.4.3 Antiproliferative Aktivität ausgewählter Verbindungen

27m, **27o**, **28f** und **29b**, die im *in vitro* Proteinkinase-Assay vielversprechende IC₅₀-Profile gezeigt hatten, wurden im Rahmen des *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) am *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität getestet. Das Screening umfasste ca. 60 humane Tumorzelllinien, die verschiedene Krebsformen bzw. Tumore repräsentieren. Dazu gehören Leukämie, Melanome, nicht kleinzelliger Lungenkrebs, Darm-, Nieren- und Ovarialkrebs sowie Tumore der Brust, der Prostata und des zentralen Nervensystems.

Zunächst erfolgte die Evaluierung aller Verbindungen bei einer Testkonzentration von 10 µM (*single dose*). Das Ergebnis wird in einem *one dose mean graph* präsentiert (Abbildung 5-11). Hierbei wird das Zellwachstum der einzelnen Zelllinien sowie das mittlere Zellwachstum aller Zelllinien gegenüber nicht behandelten Kontrollzelllinien in Prozent angegeben. Die graphische Darstellung erfolgt durch eine vertikale Linie, die dem mittleren Zellwachstum entspricht und gleich Null gesetzt wird, sowie horizontalen Balken, die das Wachstum der einzelnen Zelllinien im Vergleich zum mittleren Wachstum repräsentieren. Ist das Zellwachstum einer Zelllinie geringer als das mittlere Zellwachstum, wird die Zelllinie also stärker gehemmt als der Durchschnitt der Zelllinien, zeigt der Balken nach rechts. Ist das Wachstum größer, zeigt der Balken entsprechend nach links.

Verbindungen, die in diesem ersten Test eine signifikante Hemmung des Zellwachstums zeigen, werden anschließend bei fünf verschiedenen Konzentrationen erneut evaluiert. Aus dieser Testung lassen sich GI₅₀ (*growth inhibition 50%*), TGI (*total growth inhibition*) und LC₅₀ (*lethal concentration 50%*) bestimmen.

Die vier ausgewählten Verbindungen zeigten in der ersten Testung entweder gar keine oder lediglich eine schwache mittlere Hemmung der Zelllinien. Aufgrund dessen wurde keine zweite Evaluierung durchgeführt.

Bemerkenswert ist allerdings die selektive antiproliferative Aktivität von **27m** gegenüber der Lungenkrebszelllinie NCI-H522 sowie von **27o** gegenüber den Lungenkrebszelllinien NCI-H522 und A549/ATCC sowie der Ovarialkrebszelllinie OVCAR-8 (Abbildung 5-9).

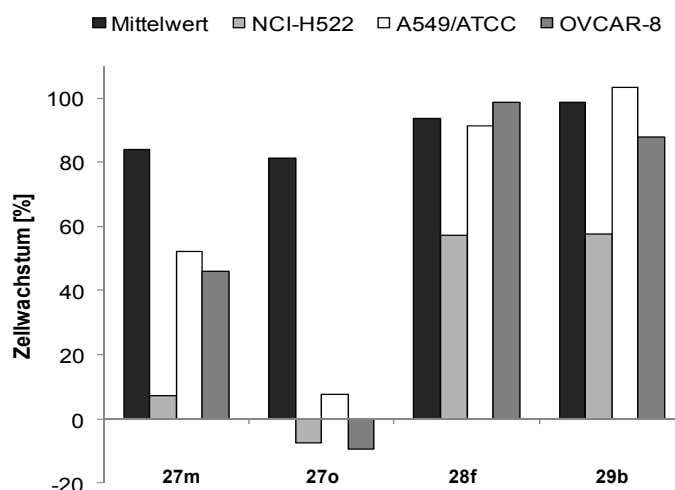


Abbildung 5-9: Zellwachstum ausgewählter Tumorzelllinien bei Inkubation mit **27m**, **27o**, **28f** und **29b** [10 μ M]

Im Rahmen des *Developmental Therapeutics Program* des NCI besteht die Möglichkeit, über die sogenannte *Molecular Target Data Application* (MTDA) Informationen über bestimmte molekulare Targets zu suchen. Mithilfe dieser Anwendung lassen sich Untersuchungen zu Expressionsmustern von bestimmten Targets in den einzelnen Zelllinien des IVCLSP finden.¹⁵² Abbildung 5-10 zeigt das Expressionslevel von SRC und IGF-1R in den Zelllinien NCI-H522, A549/ATCC und OVCAR-8 bezogen auf ihre jeweilige mittlere Expression in allen 60 Zelllinien des IVCLSP. Zeigt ein Balken nach rechts, konnte eine erhöhte Expression der Kinase festgestellt werden, weist ein Balken nach links, wurde eine vergleichsweise geringere Expression dieser Kinase in der Zelllinie ermittelt. Das Expressionsmuster von TRK-B ist nicht aufgeführt, da TRK-B mit Ausnahme von SK-OV-3 in allen Zelllinien gleichermaßen exprimiert wird. Für VEGFR-2 liegen keine Daten vor.

Das Expressionsmuster zeigte bezogen auf die Zelllinien NCI-H522, A549/ATCC und OVCAR-8 eine leicht bis stark erhöhte Expression von SRC sowie eine leicht verminderte Expression von IGF-1R im Vergleich zur mittleren Expression in allen Zelllinien des Assays. Bezogen auf SRC besteht somit eine Korrelation zwischen den Ergebnissen des Proteinkinase-Assays und der antiproliferativen Aktivität der Verbindungen. Auch in anderen Zelllinien ist eine mitunter stark erhöhte Expression der Kinasen SRC und IGF-1R feststellbar (vollständige Expressionsmuster siehe Kapitel

8.3.3). Dass die Verbindungen bei den meisten Zelllinien trotzdem und entgegen der vielversprechenden Ergebnisse im Proteinkinase-Assay keine antiproliferative Aktivität zeigten, könnte auf eine mangelnde Penetration der Substanzen in die Zellen oder entsprechend vorhandene Auswärtstransporter zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch ein Ausweichen auf alternative Signalwege innerhalb der Zelle, wodurch die Funktionstüchtigkeit der Zelle ungeachtet der Hemmung einzelner Kinasen erhalten bliebe.

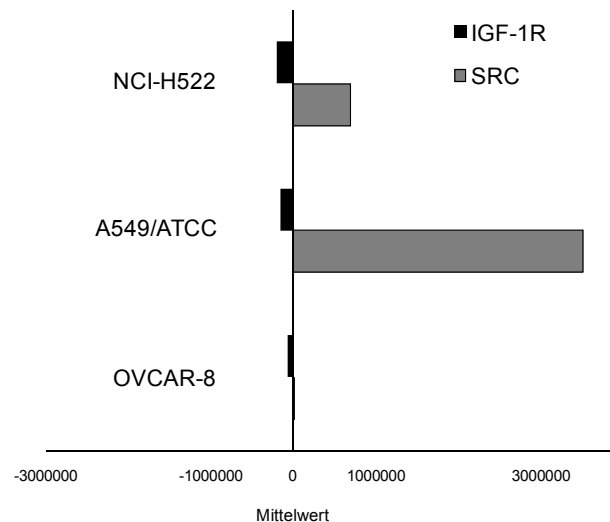


Abbildung 5-10: Relative Expressionslevel von SRC und IGF-1R in ausgewählten Zelllinien

(Die Ermittlung der Daten erfolgte mithilfe der *Molecular Target Data Application* des *Developmental Therapeutics Program* des NCI.¹⁵²)

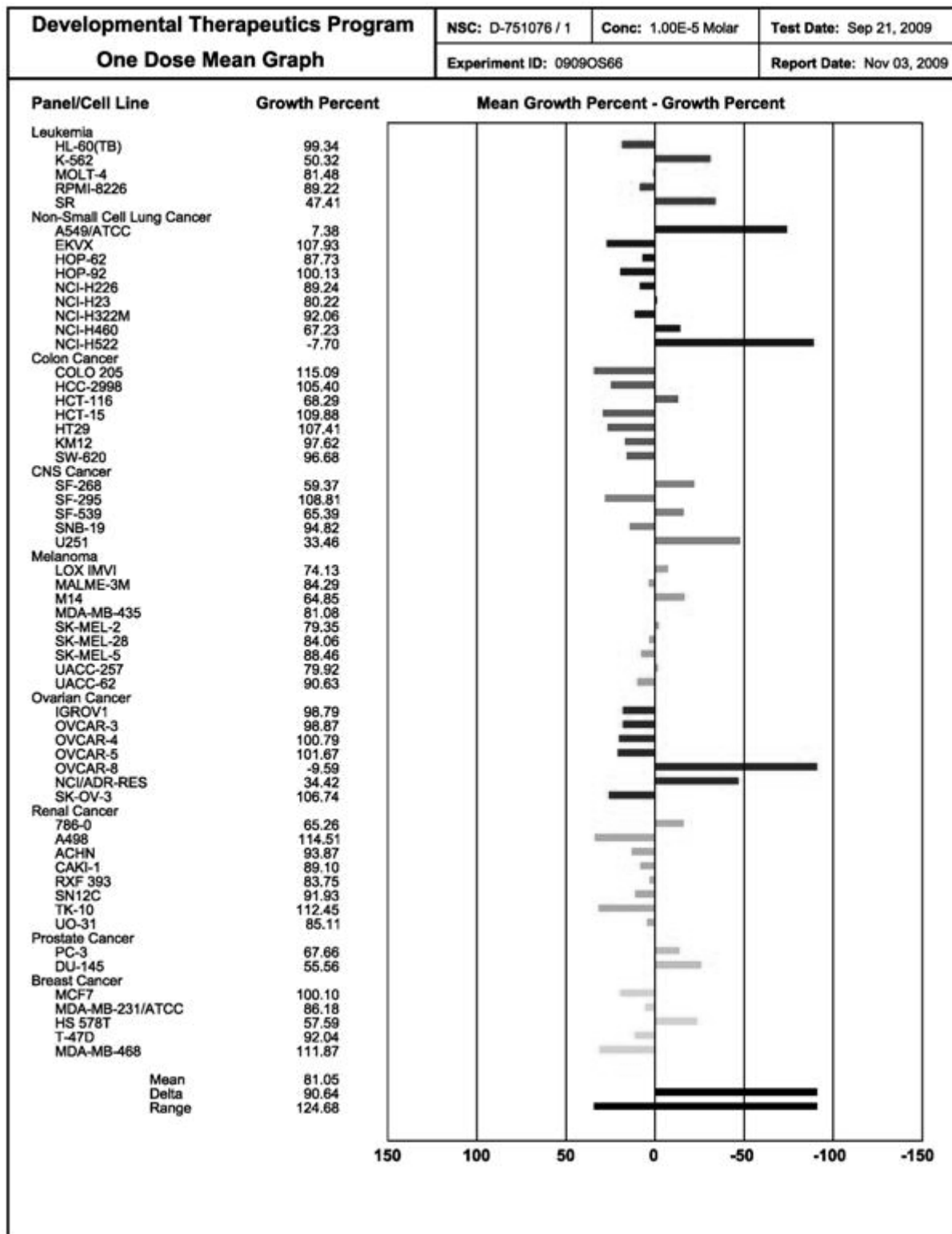


Abbildung 5-11: one dose mean graph von 27o

5.4.4 Molecular Modelling*

5.4.4.1 Docking-Studien mit c-MET

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Optimierung von c-MET Kinase-Inhibitoren auf Basis der Grundstrukturen **9** und **10**. Ein Strukturvorschlag basierte auf einem Docking von Verbindung **27d** in eine publizierte c-MET Kristallstruktur (PDB-ID: 3c1x)¹⁰², bei der es sich um ein Kokristallisat mit einem als Inhibitor fungierenden Pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-Derivat (**72**) handelt. Ein Docking der virtuellen, aus **27d** und **72** abgeleiteten Verbindung **72A** zeigte eine dem Inhibitor **72** sehr ähnliche Positionierung des Liganden in der Bindetasche. Dies führte zum Design der Verbindungen **27l-q**.

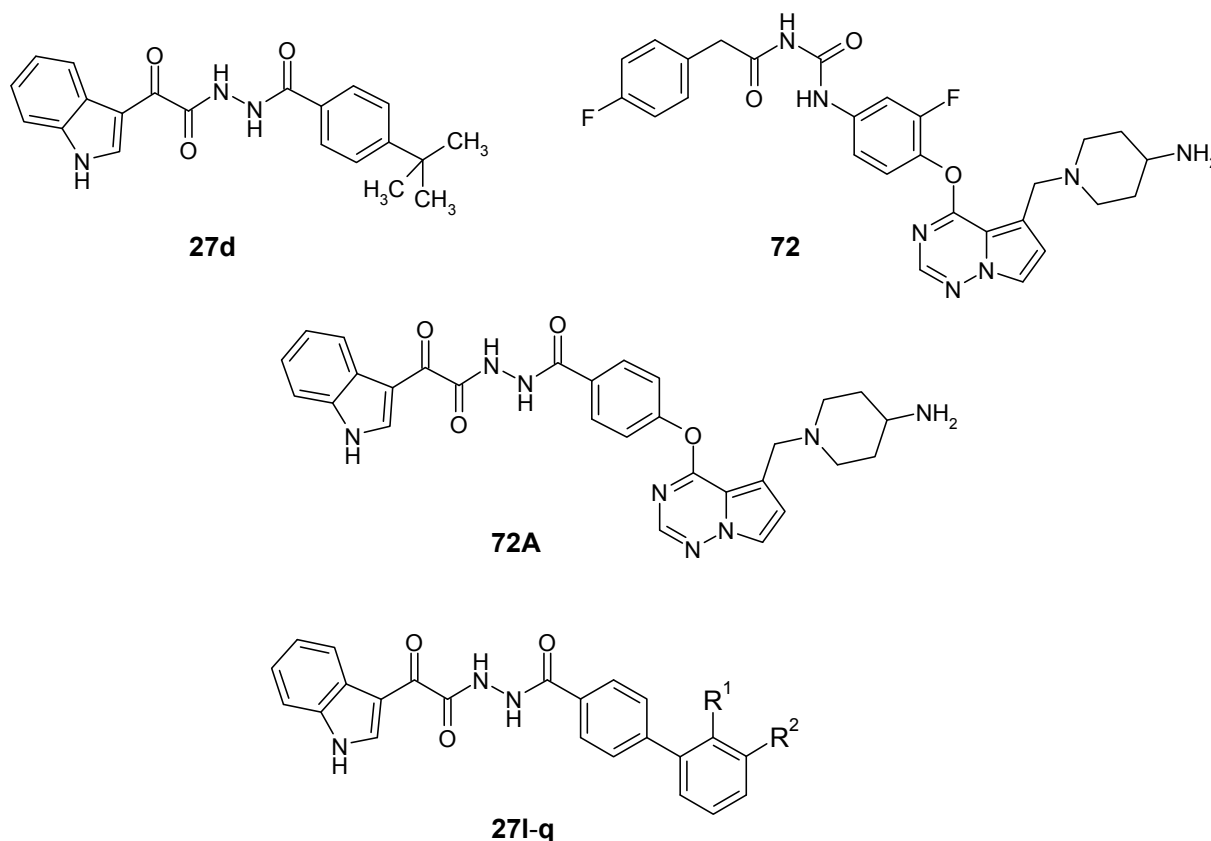


Abbildung 5-12: Aus **27d** und **72** abgeleiteter virtueller Ligand **72A** und daraus modellierte Strukturen **27l-q**

* Die Docking-Untersuchungen wurden von Dr. Lutz Preu (TU Braunschweig) durchgeführt.

Abbildung 5-13 zeigt die Überlagerung des Ursprungsliganden **72** mit der aus ihr abgeleiteten Verbindung **271** in der ATP-Bindetasche der c-MET Kinase. Die Ausrichtung innerhalb der ATP-Bindetasche ist bei **271** und **72** sehr ähnlich. Beide bilden Wasserstoffbrücken zum Asp1222 des DFG-Motivs aus. **72** zeigt zudem Wasserstoffbrücken zu Met1160 der Hinge-Region, zu Glu1127 der Helix α C sowie zu Arg1208.

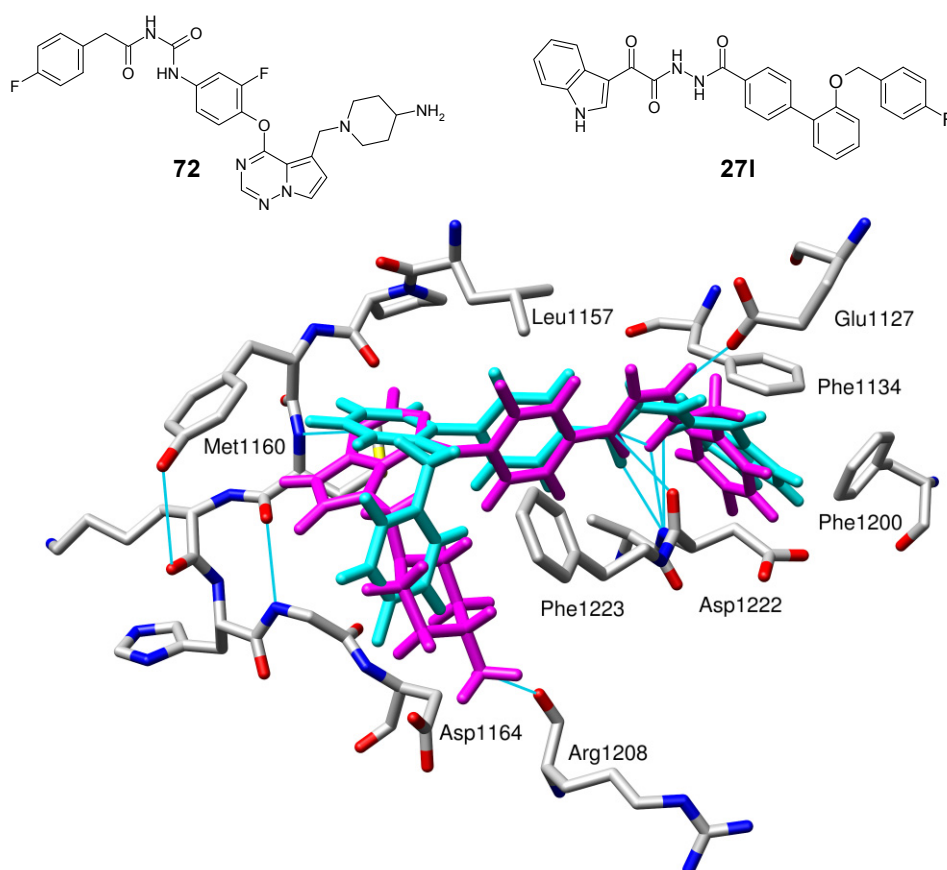


Abbildung 5-13: Überlagerung von **72** mit **271** in der ATP-Bindetasche von c-MET

(zugehörige PDB-ID: 3c1x; Der ursprüngliche Inhibitor **72** (magenta) wurde mit **271** (cyan) überlagert. Wasserstoffbrückenbindungen sind blau dargestellt. Es handelt sich um eine DFG-out-Konformation von c-MET. Visualisierung mit Chimera.¹²⁾)

Die vielversprechenden Ergebnisse der Docking-Studie korrelierten nicht mit den Ergebnissen der biologischen Testung. Die Verbindungen **271-q** zeigten nur eine leicht erhöhte inhibitorische Aktivität gegenüber c-MET bezogen auf vorherige Optimierungsversuche. Im Vergleich zu **72** (IC_{50} : 0.045 μ M) waren sie deutlich schwächer aktiv. Da

sich zudem bei den Verbindungsklassen **27**, **28** und **29** wider Erwarten eine interessante selektive Inhibition der Kinasen IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B abzeichnete, rückten diese in den Fokus der Betrachtungen. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf Docking-Studien mit dem Ziel durchgeführt, erste Hinweise auf einen potentiellen Bindungsmodus der Substanzen in den ATP-Bindetaschen dieser Kinasen zu bekommen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Docking-Experimente mit den Verbindungen **27d** und **27o** in den ATP-Bindetaschen der Kinasen SRC und IGF-1R dargestellt. Während die mit einer 4-*tert*-Butylgruppe substituierte Verbindung **27d** einen niedrig mikromolaren IC₅₀-Wert aufweist, zeigt die komplex substituierte Biphenylstruktur **27o** eine inhibitorische Aktivität im submikromolaren Bereich. Anhand einer Gegenüberstellung der hier gezeigten Docking-Lösungen soll u. a. ein Erklärungsversuch für diese Aktivitätssteigerung unternommen werden. Einzelheiten zum verwendeten Docking-Programm und der Durchführung sind in Kapitel 8.4 aufgeführt.

5.4.4.2 Docking-Studien mit SRC

Potentieller Bindungsmodus von **27d** in SRC

In Abbildung 5-14 ist eine Docking-Lösung von **27d** in der ATP-Bindetasche der SRC Kinase zu sehen. Das Docking basiert auf der Kristallstruktur einer aktiven Form der Kinase mit DFG-in-/ α C-in-Konformation (PDB-ID: 2bdf¹⁵³). **27d** bildet über die Carbonylgruppe des Benzoylrestes eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-NH von Met341 der Hinge-Region aus. Eine weitere Wasserstoffbrücke findet sich zwischen einer Carbonylgruppe des 2-Oxoacetohydrazid-Strukturelements und der Seitenkette der *gatekeeper*-Aminosäure Thr338. Da es sich hierbei um einen kleinen *gatekeeper* handelt, wird **27d** der Zugang zu der dahinter liegenden hydrophoben Tasche ermöglicht. **27d** kann hier über das Indol zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Interaktionen von niedermolekularen Proteinkinase-Inhibitoren mit Met341 und Thr338 wurden bereits in diversen Röntgenkristallstrukturen beobachtet.^{33,153-155} Die Wechselwirkungen mit Met341 (und Glu339) imitieren den typischen ATP-Bindungsmodus in der Hinge-Region. Es handelt sich hierbei um das klassische gk+1 bzw. gk+3-Bindungsmotiv (siehe Kapitel 2.2.1).¹¹

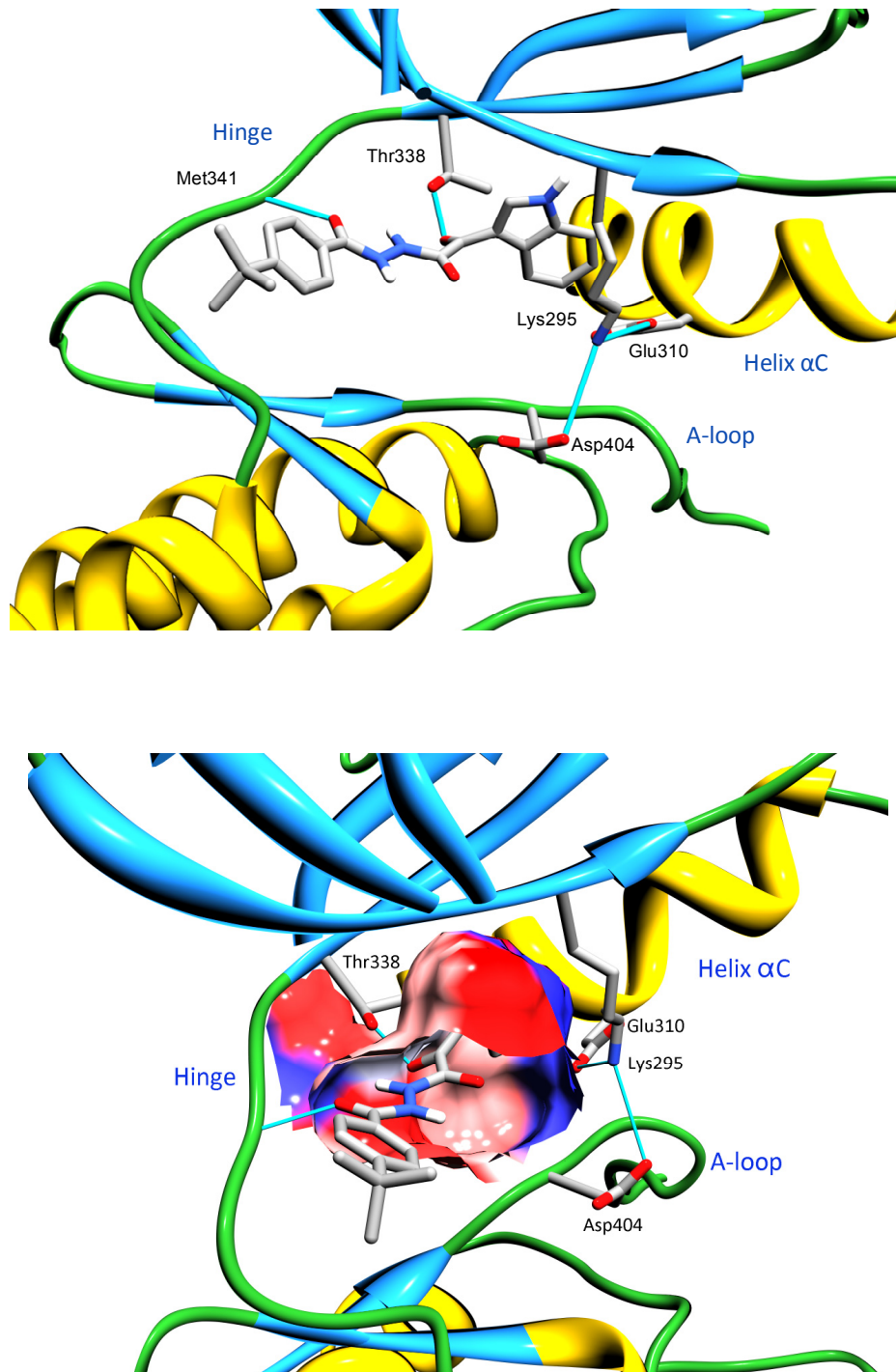


Abbildung 5-14: Potentieller Bindungsmodus von **27d** in der ATP-Bindetasche von SRC

(Das Docking erfolgte auf Basis der Kristallstruktur 2bdf.¹⁵³ Thr338: *gatekeeper*. Bei Abbildung von Oberflächen sind hydrophobe Bereiche rot und polare Bereiche dunkelblau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind hellblau dargestellt. Visualisierung mit Chimera.¹²⁾)

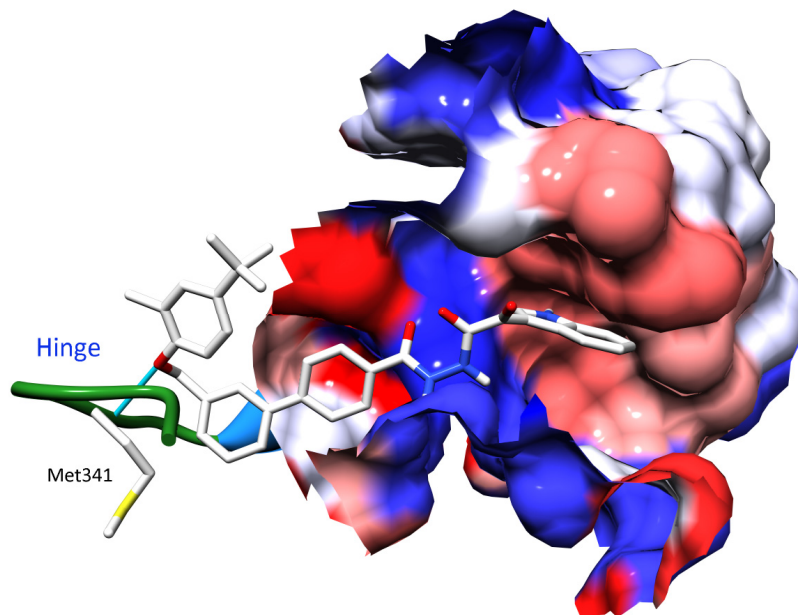
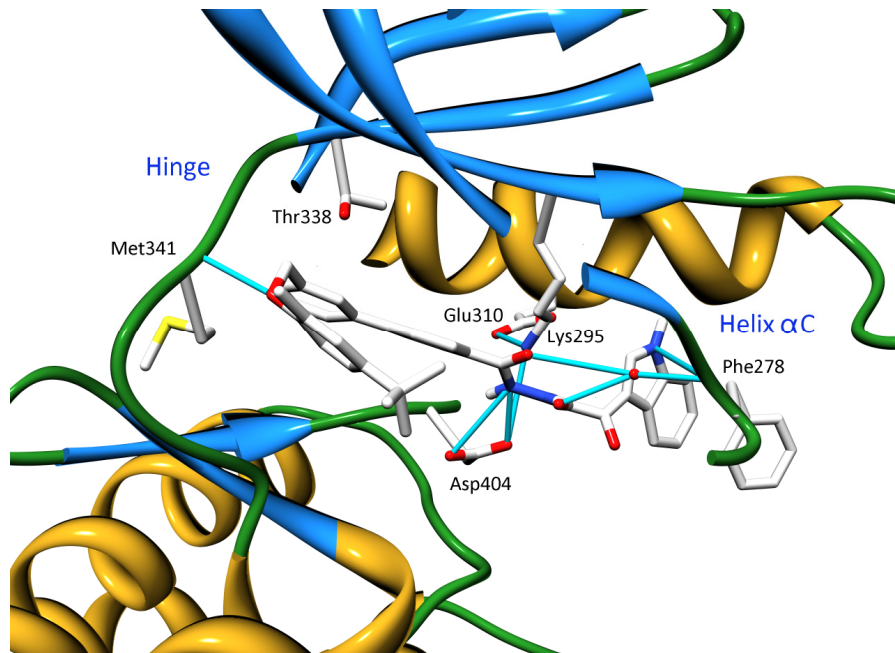


Abbildung 5-15: Potentieller Bindungsmodus von **27o** in der ATP-Bindetasche von SRC

(Das Docking erfolgte auf Basis der Kristallstruktur 2bdf.¹⁵³ Thr338: *gatekeeper*. Bei Abbildung von Oberflächen sind hydrophobe Bereiche rot und polare Bereiche dunkelblau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind hellblau dargestellt, Wassermoleküle als rote Kugel. Visualisierung mit Chimera.¹²)

Die Wasserstoffbrücke zum Thr338 scheint wiederum für die Selektivität gegenüber anderen Kinasen von Bedeutung zu sein.³³ Auch die Wechselwirkungen mit der hinter dem *gatekeeper* lokalisierten, hydrophoben Region konnten bei einigen, sich in der Entwicklung befindenden Proteinkinase-Inhibitoren beobachtet werden.^{33,155} In Docking-Studien, die zur Entwicklung neuer, vielversprechender Proteinkinase-Inhibitoren geführt haben, zeigten der sich in klinischen Prüfungen befindende Tyrosinkinase-Inhibitor Bosutinib (SKI-606, Wyeth Research) sowie der bereits zugelassene Multikinase-Inhibitor Dasatinib mit **27d** vergleichbare Interaktionen, wobei Dasatinib zwei zusätzliche Wasserstoffbrücken zum Met341 bzw. zum konservierten Lys295 aufwies.¹⁵⁵

Die gezeigte Docking-Lösung korreliert mit den Ergebnissen des Enzymassays. Entscheidend ist hierbei die Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylgruppe des Benzoylrestes von **27d** und dem *backbone*-NH von Met341 der Hinge-Region. Die Verbindungen **15-17**, die im Vergleich zu **27** keine Carbonylgruppe an der entsprechenden Stelle im zentralen Strukturelement aufweisen, zeigten keine Proteinkinase-inhibitorische Aktivität.

Potentieller Bindungsmodus von **27o** in SRC

Auch dieses Docking wurde auf Basis der Kristallstruktur 2bdf durchgeführt.¹⁵³ **27o** zeigt im Gegensatz zu **27d** einen abweichenden Bindungsmodus in SRC (Abbildung 5-15). Zwar wird auch hier eine Wasserstoffbrücke zum *backbone*-NH von Met341 der Hinge-Region ausgebildet, sie erfolgt aber ausgehend vom Sauerstoff der Etherbrücke des Substituenten. Des Weiteren erstreckt sich die Verbindung nicht wie **27d** in den hinter dem *gatekeeper* liegenden Bereich, sondern entlang der Ribose- und Phosphattasche. Auch eine solche räumliche Orientierung innerhalb der Bindetasche wurde bereits in Röntgenkristallstrukturen der SRC Kinase mit potentiellen Inhibitoren beobachtet.¹⁵³ Für **27o** ergibt sich hierbei eine neue, vorher nicht beobachtete Wasserstoffbrücke zwischen einer NH-Gruppe der zentralen Hydrazidstruktur von **27o** und der Seitenkette von Asp404 des DFG-Motivs. Zudem kann über ein Wassermolekül eine Brücke zwischen den Acylhydrazin-Carbonylgruppen und der Carbonylgruppe von Phe278 ausgebildet werden. Eine interessante Wechselwirkung ergibt sich auch durch das Indol-System. Dieses liegt in einer bislang noch unbeschriebenen hydrophoben Tasche und interagiert über ein π -*stacking* mit dem Phenylring von Phe278. Zudem kann über

das Indol-NH eine zusätzliche, wenn auch schwache Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Phe278 ausgebildet werden.

Die sich bei dieser Docking-Lösung von **27o** zusätzlich ergebenden Interaktionsmöglichkeiten mit der ATP-Bindetasche von SRC unterstützen die im Enzymassay ermittelte Aktivitätssteigerung im Vergleich zu **27d** (IC_{50} : 0.63 μ M versus 8.3 μ M). Auch wenn das bei **27d** als für die Bindung an der Hinge-Region essentiell titulierte zentrale Strukturelement in diesem Fall nicht an die Hinge-Region bindet, zeigt es doch intensive Wechselwirkungen mit relevanten Abschnitten innerhalb der ATP-Bindetasche. Somit scheint es auch hier von grundlegender Bedeutung für die inhibitorische Aktivität der Verbindung zu sein.

5.4.4.3 Docking-Studien mit IGF-1R

Potentieller Bindungsmodus von **27d** in IGF-1R

Das Docking basiert auf einer Kristallstruktur von IGF-1R mit einer DFG-in/ α C-out-Konformation (PDB-ID: 2zm3²⁴). Es handelt sich somit um eine inaktive Form der Kinase (siehe Kapitel 2.2.1). Diese Zuordnung wurde auf Basis eines Vergleichs einer aktiven DFG-in/ α C-in-Konformation mit einer inaktiven DFG-out/ α C-out-Konformation von IGF-1R getroffen. Abbildung 5-16 zeigt die Überlagerung von 1k3a²¹ (aktiv, grün), 1m7n²² (inaktiv, rot) und der bei diesem Docking verwendeten Kristallstruktur 2zm3²⁴ (blau). Während das DFG-Motiv von 1k3a und 2zm3 identisch ist, ist der Glutamatrest von 2zm3 etwas nach außen gerichtet und liegt somit in einer α C-out-Konformation vor. Dadurch kann die im aktiven Zustand vorliegende Salzbrücke zwischen dem konservierten Lysin, dem Aspartat des DFG-Motivs und dem Glutamat nicht ausgebildet werden.

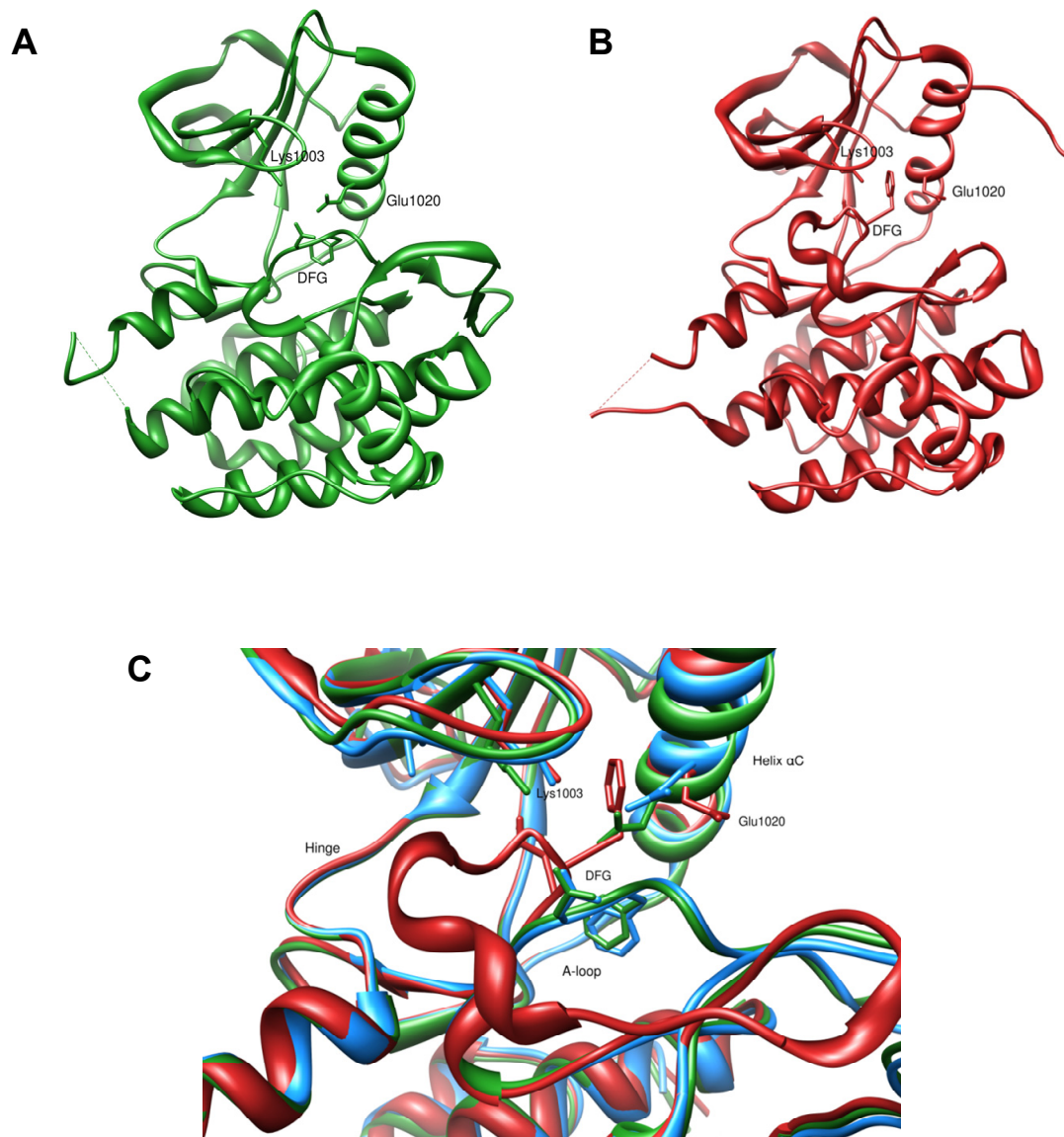


Abbildung 5-16: Vergleich der IGF-1R-Kristallstrukturen 1k3a, 1m7n und 2zm3

(A: 1k3a, aktive Konformation (DFG-in/ α C-in); B: 1m7n, inaktive Konformation (DFG-out/ α C-out); C: Überlagerung von 1k3a, 1m7n und 2zm3 (blau, DFG-in/ α C-out: inaktive Konformation))

Abbildung 5-17 zeigt eine Docking-Lösung von **27d** in der ATP-Bindetasche von IGF-1R. **27d** bindet auch in diesem Fall über das zentrale 2-Oxoacetohydrazid-Strukturelement an die Hinge-Region. Im Vergleich zum Bindungsmodus von **27d** in der ATP-Bindetasche von SRC liegt die Verbindung jedoch um 180° gedreht in der ATP-Bindetasche. Das nun aus der Bindetasche heraus, in Richtung Lösungsmittelzugewandte Region zeigende Indol interagiert über ein Wassermolekül mit der Seitenkette von Arg1003. In der Hinge-Region bildet **27d** über eine NH-Gruppe der Hydrazidstruktur sowie über die Carbonylgruppe des Benzoylrestes Wasserstoffbrücken zum *backbone* von Met1082 aus (gk+3-Motiv¹¹). Diese Wechselwirkung wurde in diversen Röntgenkristallstrukturen, u. a. auch bei dem ursprünglichen, in 2zm3 kokristallisierten Inhibitor beobachtet.^{24,156,157} Zu der *gatekeeper* Aminosäure Met1079 wird in diesem Fall keine Wasserstoffbrücke ausgebildet. Da es sich zudem bei Methionin im Gegensatz zu Threonin um einen *gatekeeper* mittlerer Größe handelt, bleibt **27d** hier auch der Zugang zu der dahinter liegenden hydrophoben Tasche versperrt. Insgesamt liegt das Molekül weniger tief in der ATP-Bindetasche als bei SRC.

Diese Docking-Lösung korreliert ebenso mit den Ergebnissen der biologischen Testung, wie die Docking-Lösung von **27d** in SRC, da u. a. abermals die Carbonylgruppe des Benzoylrestes mit Met1082 (gk+3) der Hinge-Region interagiert. Das Fehlen des Benzoylrestes in den Verbindungsklassen **15-17** führte zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität.

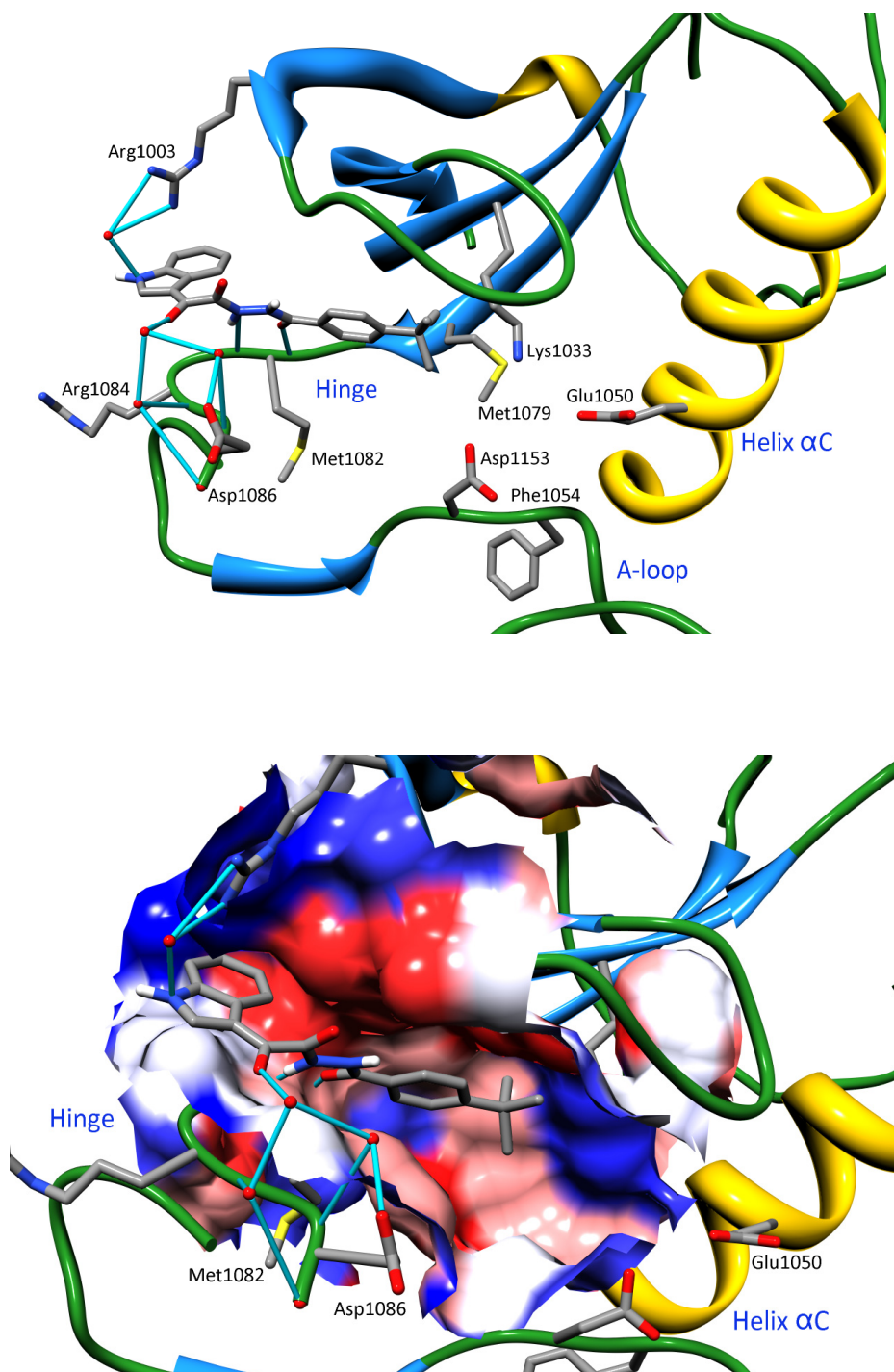


Abbildung 5-17: Potentieller Bindungsmodus von **27d** in der ATP-Bindetasche von IGF-1R

(Das Docking erfolgte auf Basis der Kristallstruktur 2zm3.²⁴ Met1079: *gatekeeper*; Bei Abbildung von Oberflächen sind hydrophobe Bereiche rot und polare Bereiche dunkelblau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind hellblau dargestellt, Wassermoleküle als rote Kugel. Visualisierung mit Chimera.¹²)

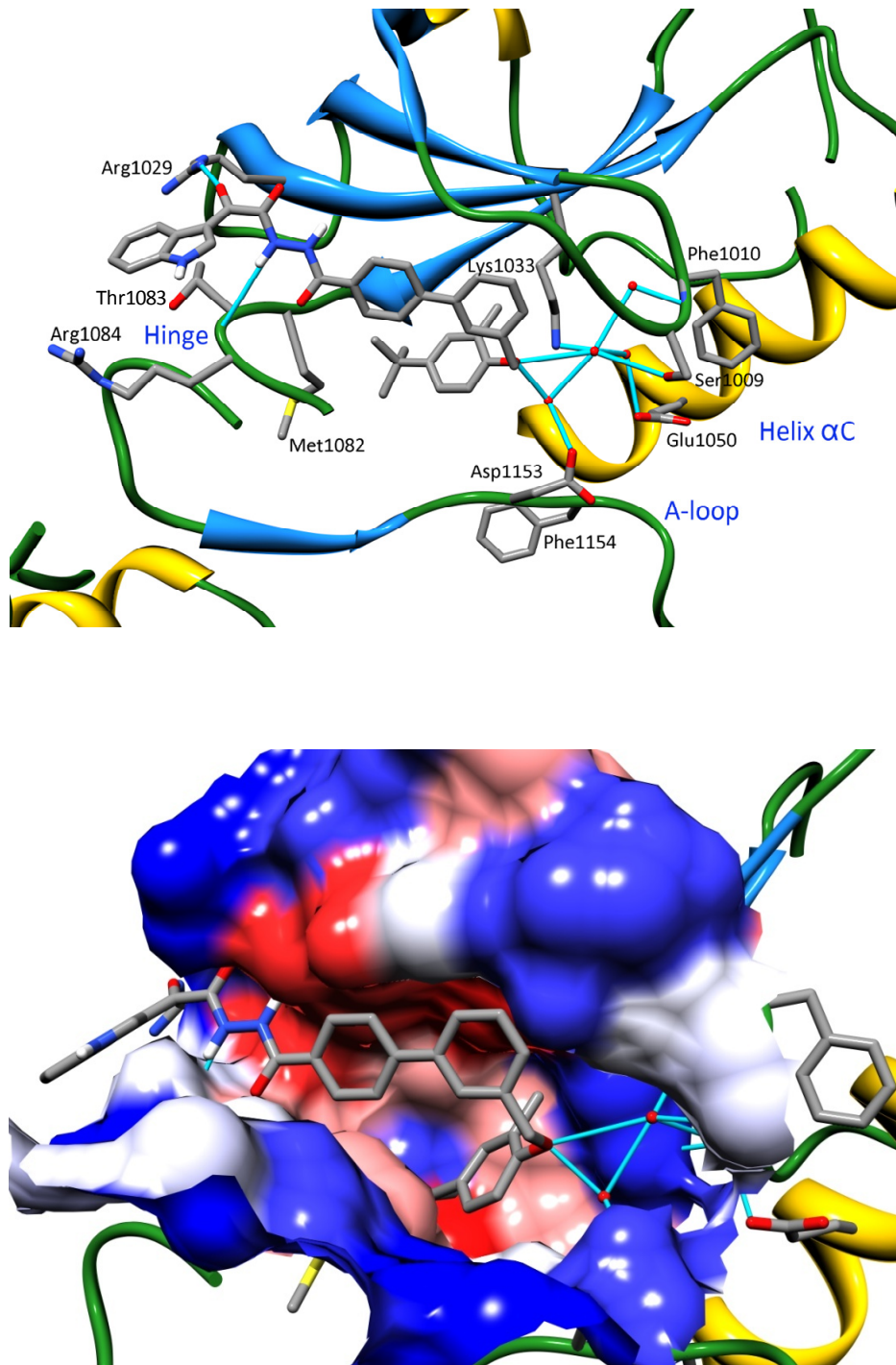


Abbildung 5-18: Potentieller Bindungsmodus von **27o** in der ATP-Bindetasche von IGF-1R

(Das Docking erfolgte auf Basis der Kristallstruktur 2zm3.²⁴ Bei Abbildung von Oberflächen sind hydrophobe Bereiche rot und polare Bereiche dunkelblau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind hellblau dargestellt, Wassermoleküle als rote Kugel. Visualisierung mit Chimera.¹²)

Potentieller Bindungsmodus von **27o** in IGF-1R

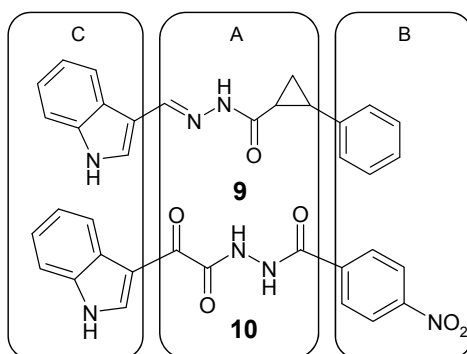
Auch diesem Docking liegt die Kristallstruktur 2zm3 zugrunde.²⁴ Die Ausrichtung von **27o** erscheint der von **27d** in IGF-1R sehr ähnlich, wobei **27o** etwas tiefer in der ATP-Bindetasche liegt (Abbildung 5-18). Das Indol ragt auch hier aus der Bindetasche heraus, es bildet jedoch in diesem Fall keine Wasserstoffbrücke aus. Auch die Bindungsmuster an der Hinge-Region unterscheiden sich bei **27d** und **27o**. Bei **27o** bildet die Carbonylgruppe in Position 2 des zentralen 2-Oxoacetohydrazid-Strukturelements eine Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Arg1029 aus, während eine NH-Gruppe der Hydrazidstruktur über eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe von Thr1083 (gk+4) der Hinge-Region wechselwirkt. Diese Interaktion ist eher ungewöhnlich, da meist das oben angesprochene gk+1 bzw. gk+3-Motiv beobachtet wird.¹¹ Bezüglich der generell bestehenden Selektivitätsproblematik gegenüber IR könnte aber ein solcher Bindungsmodus von Vorteil sein. IGF-1R und IR unterscheiden sich in der ATP-Bindetasche nur geringfügig in ihrer Aminosäuresequenz. Dies betrifft u. a. Thr1083 und Arg1084. Beim IR sind an dieser Stelle Alanin bzw. Histidin zu finden. Sind diese Aminosäuren an Wechselwirkungen mit dem Inhibitor beteiligt, könnte sich dies positiv auf das Selektivitätsverhältnis auswirken ($IC_{50} \text{ IR} / IC_{50} \text{ IGF-1R}$).^{21,23,24} **27o** interagiert in der hier dargestellten Docking-Lösung mit Thr1083. Das Selektivitätsverhältnis beträgt 5.4. Im Gegensatz dazu zeigt der ursprüngliche, in 2zm3 kokristallisierte Inhibitor, der weder mit Thr1083 noch mit Arg1084 wechselwirkt, lediglich ein Selektivitätsverhältnis von 0.57.²⁴ Dieser vermutete Zusammenhang ist allerdings sehr kritisch zu betrachten. **27d** zeigt keine Wechselwirkung mit Thr1083 oder Arg1084, das Selektivitätsverhältnis beträgt jedoch 370. Dies verdeutlicht, dass auch andere, hier nicht näher betrachtete Gesichtspunkte entscheidenden Einfluss auf das Selektivitätsverhältnis haben (vgl. auch Kapitel 2.3.2).

Die *tert*-Butylgruppe aus **27d** wurde in **27o** durch einen voluminösen, lipophilen Substituenten ersetzt. Diesem wird durch den vergleichsweise großen *gatekeeper* der Zugang zu der dahinter liegenden hydrophoben Tasche verwehrt. Es kommt zu einer ringförmigen Ausrichtung des Substituenten, der sich in eine weitere, unterhalb des *gatekeepers* befindliche lipophile Tasche erstreckt, die ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Alkyl-substituierten Phenylring ermöglicht. Darüber hinaus kann eine über ein Wassermolekül verbrückte Bindung vom Sauerstoff der Etherfunktion zur Seitenkette von Asp1153 des DFG-Motivs ausgebildet werden.

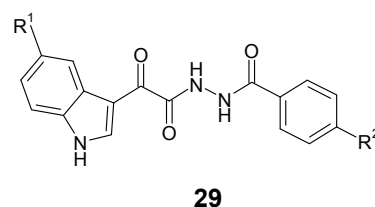
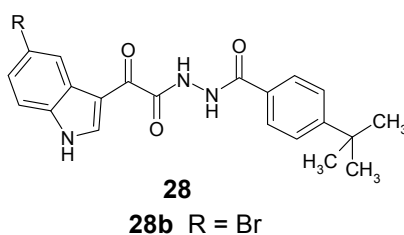
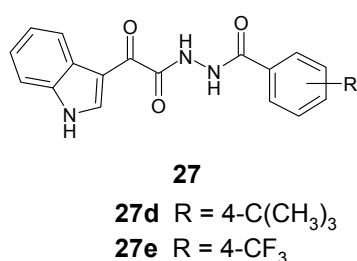
Wie bei den Ergebnissen der Docking-Experimente in SRC untermauern auch hier die sich bei dieser Docking-Lösung von **27o** zusätzlich ergebenden Interaktionsmöglichkeiten mit der ATP-Bindetasche von IGF-1R die im Enzymassay ermittelte Aktivitätssteigerung im Vergleich zu **27d** (IC_{50} : 0.68 μ M versus 4.9 μ M).

6 Zusammenfassung

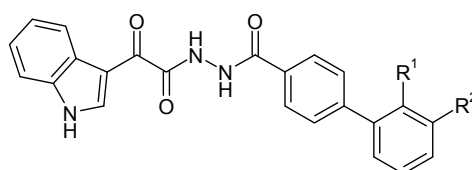
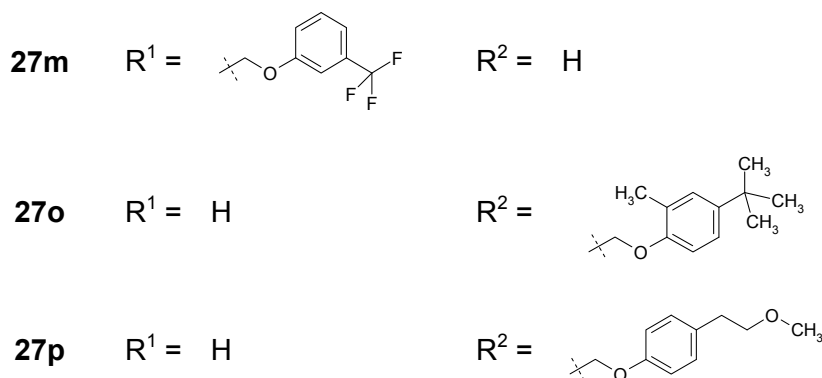
Ausgehend von den Verbindungen **9** und **10**, die auf Basis eines virtuellen Screenings als schwach potente, selektive Inhibitoren der c-MET Kinase identifiziert wurden, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Synthese und Charakterisierung potentieller Proteinkinase-Hemmstoffe zum Aufbau einer fokussierten Substanzbibliothek.



Bei der systematischen Modifizierung der Ausgangsverbindungen **9** und **10** erwies sich das in Grundstruktur **10** enthaltene zentrale Strukturelement A für die inhibitorische Aktivität als essentiell. Unter Beibehaltung des neuartigen *N'*-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid-Grundgerüsts erfolgten im weiteren Verlauf Substitutionen an den aromatischen Systemen B und C, aus denen die Verbindungen **27-29** hervorgingen. Diese zeigten eine moderat erhöhte inhibitorische Aktivität gegenüber der c-MET Kinase. Zugleich wiesen die Verbindungen eine vielversprechende biologische Aktivität gegenüber den zu Beginn des Projekts nicht relevanten Kinasen IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B auf. Sie rückten in den Fokus der weiteren Betrachtungen.



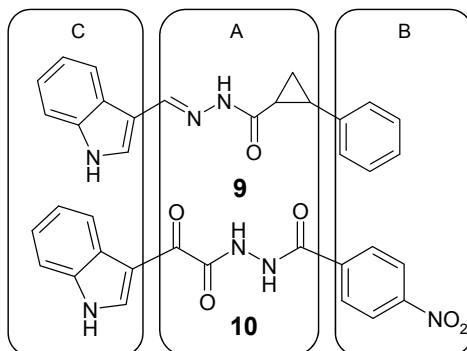
Die Einführung einer *tert*-Butyl- (**27d**) bzw. Trifluormethylgruppe (**27e**) in Position 4 des Phenylrings hatte eine deutliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber den oben genannten Kinasen mit IC₅₀-Werten im einstellig mikromolaren Bereich zur Folge. Zudem besaßen die Verbindungen keine Aktivität am Insulinrezeptor. Die Derivatisierung von **27d** durch Einbringen eines Bromsubstituenten in Position 5 des Indols (**28b**) führte zu einer nochmals verbesserten Aktivität an IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B bei einer auch in diesem Fall nicht bestehenden Hemmung des IR.

**27l-q**

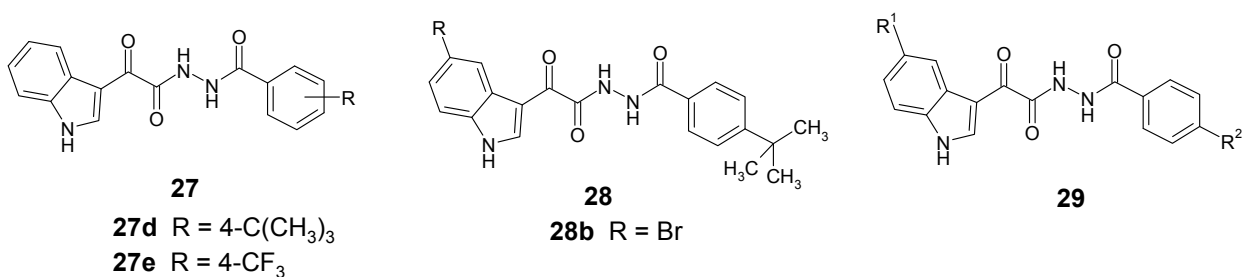
Eine zum Teil submikromolare Aktivität gegenüber IGF-1R, VEGFR-2, SRC und TRK-B zeigten die mittels Mikrowellen-unterstützter Suzuki-Kupplung dargestellten Biphenylstrukturen **27l-q**. Die inhibitorische Aktivität an den genannten Enzymen konnte somit um mehr als zwei Größenordnungen gegenüber den Ausgangsverbindungen **9** und **10** verbessert werden. Die aktivsten Vertreter waren **27m**, **27o** und **27p**. In einem SRC-spezifischen zellulären Phosphorylierungsassay zeigten **27m**, **27o** und **27p** hingegen keine Aktivität. Des Weiteren wurden **27m** und **27o** zur Bestimmung ihrer anti-proliferativen Aktivität beim *National Cancer Institute* an ca. 60 tumorrelevanten Zelllinien getestet. Dabei konnte eine selektive Hemmung einzelner Lungen- bzw. Ovarialkrebszelllinien festgestellt werden.

7 Summary

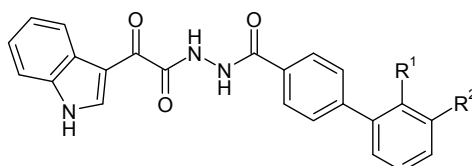
Within the scope of a virtual screening compounds **9** and **10** were identified as weak, but selective inhibitors of the c-MET kinase. In the course of this thesis potential kinase inhibitors related to **9** and **10** were synthesized to establish a focused library of structural diverse compounds.



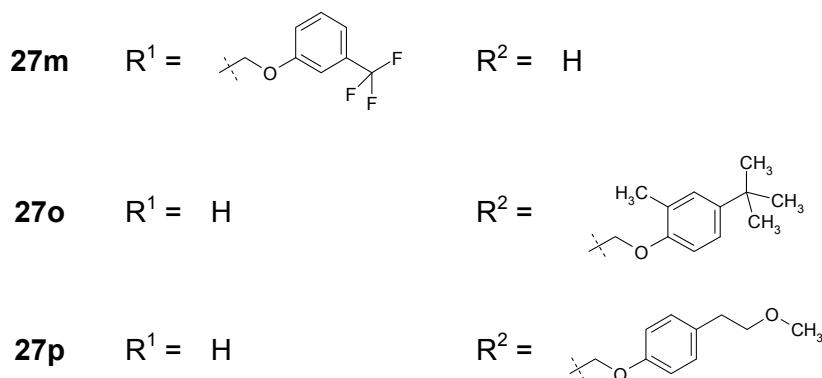
A structure modification campaign revealed motif A of compound **10** to be essential for kinase inhibitory activity. Based on the new *N'*-aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoaceto-hydrazide parent scaffold, substitutions at the aromatic systems B and C were performed, leading to compounds **27-29**. They showed slightly improved potency against the c-MET kinase. Moreover, a promising inhibitory activity of **27-29** against IGF-1R, VEGFR-2, SRC and TRK-B could be observed. Hence, further investigations were focused on these kinases.



The insertion of a *tert*-butyl- (**27d**) and trifluoromethyl-moiety (**27e**) at the phenyl C-4 position caused a significant increase in inhibitory activity against IGF-1R, VEGFR-2, SRC and TRK-B, whereas no inhibition of IR was detected. Derivatisation of **27d** by incorporation of a bromine in the 5-position of the indole (**28b**) gave further enhancement of potency against the desired kinases, still without effecting IR.



27l-q



The biphenylic structures **27l-q**, which were prepared via microwave-promoted Suzuki-coupling reaction, demonstrated potent inhibition of IGF-1R, VEGFR-2, SRC and TRK-B with IC_{50} -values in the submicromolar range. Thus, the inhibitory activity against these kinases increased by two orders of magnitude compared to the hit structures **9** and **10**. **27m**, **27o** and **27p** represent the derivatives with the highest inhibitory activity. However, they did not have effects in a SRC-specific cellular phosphorylation assay. Furthermore, **27m** and **27o** were tested at the National Cancer Institute for their antiproliferative activity towards approximate 60 cancer related cell lines. They exhibited a selective inhibition of particular lung- and ovarian cancer cell lines.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

8.1.1 Methoden und Geräte

Dünnschichtchromatographie

DC-Mikroarten Polygram® Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion bei 254 nm und 366 nm; häufig verwendete Fließmittel: Ethylacetat/Toluen-Gemische (1:2, 1:1, 2:1), Ethylacetat/Petrolether-Gemische (1:2, 1:1, 2:1).

Elementaranalytik

CE Instruments FlashEA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA;

Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), analytisch

LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt;

Probenvorbereitung: 1 mg Probe wurde in 1000 µl DMSO gelöst. 200 µl dieser Lösung wurden nochmals mit 800 µl DMSO verdünnt und anschließend durch einen Acrodisc® MHP 13 µm Filter filtriert. Die gemessene Absorption des Hauptpeaks im Peakmaximum sollte im Bereich 300-800 mAU liegen. Gegebenenfalls wurde eine Anpassung der Probenkonzentration vorgenommen.

Elution: Injektionsvolumen: 10 µl; Flussrate: 1.000 ml/min; isokratisch; Gesamtlaufzeit: 15 min; angestrebte Gesamtretentionszeit: 3-8 min.

Elutionsmittel: Gemische aus Wasser oder Wasser/Ameisensäure 0.05% (pH 2.5-2.7) und Acetonitril.

Detektion: DAD bei 254 nm und 280 nm, ggf. Auswahl einer anderen Wellenlänge, wenn trotz Probenkonzentrierung keine ausreichende Absorption erzielt wurde. Die Änderung der Wellenlänge erfolgte unter der Voraussetzung, dass bei 254 nm bzw. 280 nm keine Verunreinigungen im Chromatogramm erkennbar waren.

Auswertung: Integration der Peakflächen und Auswertung mittels 100%-Methode, Integrationsausschluss: 1.55 min, Threshold: 500; Bestimmung von Nettoretentionszeit t_N und Totzeit t_M bezogen auf DMSO; Angabe der Absorptionsmaxima der ermittelten UV-Spektren; Verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), präparativ

LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector, Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser 25 mm, gekoppelt an einen Merck Selbstfüllstand NW25, Säulenmaterial Merck: LiChrospher® 100 RP-18, 12 μ m, Fa. Merck, Darmstadt; Probenschleife (max. Injektionsvolumen: 5 ml), Fa. Knauer, Berlin.

Elution: Flussrate: 40 ml/min; isokratisch;

Elutionsmittel: Gemische aus Wasser und Acetonitril;

Detektion: 254 nm.

Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA;

Die Vermessung von festen Substanzen erfolgte als Kaliumbromid-Pressling, ölige Substanzen wurden auf einem Natriumchlorid-Fenster vermessen.

Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 (^1H -NMR-Messung: 400.1 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 100.6 MHz), Bruker Avance II-600 (^1H -NMR-Messung: 600.1 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 150.9 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig;

Interner Standard: Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala.

^1H -NMR: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

^{13}C -NMR: Die Aufnahme der Spektren erfolgte ^1H -breitbandentkoppelt. Der Zusatz (2C) weist auf ein überlagertes Signal zweier magnetisch äquivalenter Kohlenstoffatome hin. Zusätzlich wurde routinemäßig eine ^{13}C -DEPT135-Messung durchgeführt.

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = das Signal tritt verbreitert auf.

Lösungsmittel

Wenn nicht anders angegeben, wurden nicht getrocknete Lösungsmittel verwendet. Die Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte ggf. in Anlehnung an publizierte Methoden.¹⁵⁸

tert-Butylmethylether: Die Trocknung erfolgte durch Lagerung über Kaliumhydroxid. Vor Benutzung wurde der Ether filtriert.

Diethylether: Zum Vortrocknen wurde der Ether zunächst mehrere Tage über Kaliumhydroxid gelagert. Anschließend wurde er destilliert und über Natriumdraht aufbewahrt.

Ethanol: Ethanol (mindestens 99%) wurde in einer Apparatur mit Dreihalskolben und Rückflusskühler mit Metallwendel vorgelegt und ca. 7-10 g Natriumschnitzel pro Liter portionsweise zugegeben. Es wurde so lange erhitzt bis das Natrium komplett in Lösung gegangen war, anschließend ca. 30 g/l Phthalsäurediethylester hinzugefügt und die Mischung für weitere 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Destillation des Ethanols erfolgte die Lagerung über Molekularsieb 3 Å.

Pyridin: Nach Vortrocknen über Kaliumhydroxid wurde das Pyridin über eine Kolonne destilliert und die Fraktion benutzt, die bei 114-116 °C überging. Die Lagerung erfolgte über Molekularsieb 4 Å.

Toluen: Toluen wurde in einem Rundkolben mit Wasserabscheider, Kühler und Trockenrohr zum Reflux erhitzt. Das sich im Wasserabscheider befindende Kondensat wurde bis zur nicht mehr bestehenden Trübung abgelassen. Nach dem Abkühlen wurden etwa 15 g/l Calciumchlorid hinzugefügt und ein Tropftrichter mit Druckausgleich zwischen Kolben und Kühler eingefügt. Bei geöffnetem Hahn wurde weitere 2-3 h refluxiert, bevor durch Schließen des Hahns das Toluen aufgefangen werden konnte. Die Lagerung erfolgte über Molekularsieb 4 Å.

Massenspektrometrie

Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen; Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig;

Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard: Perfluorkerosin.

Mikrowellen-Synthese

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Typ Discover; Chem Driver™ Application Software Program; Reaktionsgefäße: 10 ml mit Teflonseptum (geschlos-

senes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

Säulenchromatographie

Kiesegel 60 Å (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt;
Säulendurchmesser: 2.5-3 cm, Füllhöhe: 15-30 cm.

Schmelzpunkte

Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

8.1.2 Kommerziell erworbene Substanzen

Die Verbindungen **19** wurden von der Firma Ambinter (Paris, Frankreich) erworben. Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden über Acros Organics (Geel, Belgien) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

8.2 Synthesen und analytische Daten

AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N*-Arylalkyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide **16** und **17** sowie der *N'*-Aryl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **15a** und **15d**

Methode A

Zu einer bei 0 °C gerührten Lösung des entsprechenden Amins **32** bzw. **33** (1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (8 ml) bzw. einer Suspension des jeweiligen Phenylhydrazins **31** (1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (8 ml) wird erst Triethylamin (153 µl, 1.10 mmol) und dann langsam eine Suspension von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**; 208 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (12 ml) gegeben. Es wird 15 min bei 0 °C und anschließend bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (0.5-1.5 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Die organische Phase wird je dreimal mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser (je 20 ml) gewaschen und nach Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Feststoff wird aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert. Verbindung **15d** muss vor dem Umkristallisieren zunächst säulenchromatographisch getrennt werden. Zur Vorbereitung hierfür wird der organischen Phase nach dem Waschen Kieselgel (1.5 g) zugesetzt und diese dann am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Petrolether (1:1) über eine Säulenlänge von 25 cm. Die gewünschten Fraktionen werden anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und der zurückbleibende Feststoff aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Methode B

Triethylamin (153 µl, 1.10 mmol) wird tropfenweise zu einer bei 0 °C gerührten Suspension von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**; 208 mg, 1.00 mmol) und dem entsprechenden Amin **32** bzw. **33** (1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (20 ml) gegeben. Nach fünfzehnminütigem Rühren bei 0 °C wird bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (1-5 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Die organische Phase wird je dreimal mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser (je 20 ml) gewaschen. Nach Trocknen der Etherphase über wasserfreiem Natriumsulfat und Einengen im Vakuum wird der verbleibende Feststoff aus Ethanol 70% umkristallisiert.

AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N'*-Aryl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylhydrazide **15b** und **15c**

Eine Lösung von Triethylamin (306 µl, 2.2 mmol) in getrocknetem MTBE (4 ml) wird tropfenweise unter Rühren bei 0 °C zu einer Suspension des jeweiligen Phenylhydrazin-Hydrochlorids **31** (1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (8 ml) gegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Es folgt die langsame Zugabe einer Suspension von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30a**; 208 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (12 ml). Das Gemisch wird weitere 15 min bei 0 °C und dann bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (1-2 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Die organische Phase wird je dreimal mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser (je 20 ml) gewaschen. Nach Trocknen der Etherphase über wasserfreiem Natriumsulfat und Einengen im Vakuum wird der verbleibende Feststoff aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert. Im Fall der Verbindung **15c** ist eine säulenchromatographische Trennung notwendig. Zur Vorbereitung hierfür wird der organischen Phase nach dem Waschen Kieselgel (1.5 g) zugesetzt und diese dann am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Petrolether (1:1) über eine Säulenlänge von 30 cm. Die gewünschten Fraktionen werden nach Entfernen des Elutionsmittels im Vakuum aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N'*-[2-Oxo-2-phenylethyliden]-benzhydrazide **18**

Zu einer Lösung von Phenylglyoxal-Monohydrat (**34**; 304 mg, 2.00 mmol) in dem angegebenen Lösungsmittel (Methanol oder Ethanol, 3 ml) wird das entsprechende Benzhydrazid **35** (1.00 mmol) gegeben und bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (1-5 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt, fünfmal mit 1 ml des verwendeten Lösungsmittels gewaschen und anschließend aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

AAV 4: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]benzamide **21a-d**, *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]isonicotinamid (**21e**) und *N*-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]cyclohexancarboxamid (**21f**)

Das entsprechende Nitril **37** bzw. **38** (1.00 mmol) wird mit *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (**36**; 177 mg, 1.00 mmol) in konzentrierter Schwefelsäure (5 ml) gemischt und bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (15-23 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Durch Gießen auf Eis wird das Produkt gefällt. Es wird abgesaugt, mit Wasser (ca. 25 ml) gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Zur Aufarbeitung von **21e** wurde das nach dem Gießen auf Eis vorliegende Gemisch mit konzentriertem Ammoniak alkalisiert. Das hierbei als gallertartiger Niederschlag gefällte Produkt konnte durch Extraktion mit Ethylacetat isoliert werden.

AAV 5: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 4-(1*H*-Indol-3-yl)-1(2*H*)-phthalazinone **25** und der 4-Anilino-1(2*H*)-phthalazinone **26**

Eine Lösung des jeweiligen 1-Chlor-4-(1*H*-indol-3-yl)phthalazins **64** (1.00 mmol) bzw. des *N*-Aryl-*N*-(4-chlorphthalazin-1-yl)amins **69** (1.00 mmol) in Eisessig (20 ml) wird unter Zusatz von Natriumacetat (164 mg, 2.00 mmol) 1 h bei 110 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Mischung wird anschließend unter Rühren in Eiswasser (50 ml) gegossen und weitere 20 min gerührt, wobei es zur Bildung eines Niederschlags kommt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

AAV 6: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der *N*'-Aroyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazide **27a-p**, **28a-f** und **29a-b** sowie *N*-{[4'-{2-[2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetyl]hydrazino}carbonyl][1,1'-biphenyl]-3-yl]methyl}methansulfonamid (**27q**)

Triethylamin (153 µl, 1.10 mmol) wird tropfenweise zu einer bei 0 °C gerührten Suspension des entsprechenden 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorids **30** bzw. **78** (1.00 mmol) und des jeweiligen Benzhydrazids **35**, **70** bzw. **74** (1.00 mmol) in getrocknetem MTBE (20 ml) gegeben. Nach fünfzehnminütigem Rühren bei 0 °C wird bis zur

vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (1-23 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Die organische Phase wird im Vakuum bis zur Trockne eingengt und der zurückbleibende Feststoff anschließend je dreimal mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser (je 20 ml) gewaschen und mit Petrolether gespült. Das Produkt wird aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

AAV 7: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 1,1'-Biphenyl-4-carbohydrazide **74**

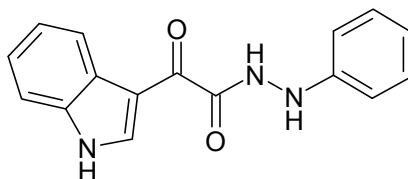
4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 262 mg, 1.00 mmol), die jeweilige Boronsäure **73** (1.00 mmol), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (149 µl, 1.00 mmol) und 5 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (58 mg, 0.050 mmol) werden in ein Synthese-Mikrowellen-Gefäß gewogen, gemischt und mit Wasser und Ethanol (je 1 ml) versetzt. Das Gefäß wird mit einem Teflonseptum verschlossen und der Ansatz im Synthese-Mikrowellen-Gerät erhitzt. Die Reaktion wird bei folgenden Einstellungen durchgeführt: Reaktionszeit 10 min, 150 °C, 60 Watt, ramp time 5 min, Maximaldruck 250 psi. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz mit Wasser und Ethylacetat (je 20 ml) versetzt, filtriert und in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wird insgesamt dreimal mit Ethylacetat (je 20 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das dabei zurückbleibende Produkt wird mit Ausnahme von **74f** ohne Reinigung weiter umgesetzt. **74f** wird nach der Extraktion mit Ethylacetat mittels Säulenchromatographie aufbereitet. Hierfür wird zunächst das Ethylacetat in Anwesenheit von Kieselgel (ca. 1.5 g) im Vakuum entfernt. Die Elution erfolgt mit Ethylacetat über einer Säulenlänge von ca. 15 cm. Die gewünschten Fraktionen werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

AAV 8: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese der 5-Aryl-1*H*-indole **77**

5-Brom-1*H*-indol (**63c**; 196 mg, 1.00 mmol), die jeweilige Boronsäure **73** (1.00 mmol), Natriumcarbonat (318 mg, 3.00 mmol), Tetrabutylammoniumbromid (322 mg, 1.00 mmol) und 0.4 mol% Palladium(II)acetat (1 mg, 0.004 mmol) werden in ein Synthese-Mikrowellen-Gefäß gewogen, gemischt und mit Wasser (2 ml) versetzt. Das Gefäß wird mit einem Teflonseptum verschlossen und der Ansatz im Synthese-Mikrowellen-Gerät erhitzt. Die Reaktion wird bei folgenden Einstellungen durchgeführt: Reaktionszeit 5 min, 150 °C, 60 Watt, ramp time 10 min, Maximaldruck 250 psi. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz mit Wasser und Ethylacetat (je 30 ml) versetzt, filtriert und in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wird insgesamt dreimal mit Ethylacetat (je 30 ml) extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über wasserfreiem Natriumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende Produkt wird mit Ausnahme von **77a** ohne weitere Reinigung für anschließende Synthesen verwendet. Das bei **77a** entstehende Produktgemisch wird mittels präparativer HPLC getrennt (Fließmittel: ACN/Wasser, 50:50). Das Produkt wird aus den entsprechenden Fraktionen nach Entfernen des Acetonitrils am Rotationsverdampfer durch dreimalige Extraktion der wässrigen Phase mit Ethylacetat (je 20 ml) isoliert.

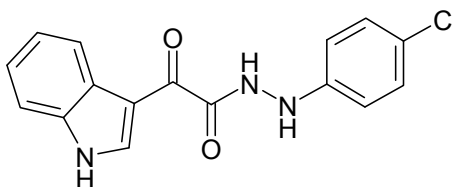
AAV 9: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von 2-(5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30b**), 2-(5-Brom-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30c**) und der 2-(5-Aryl-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchloride **78**

Oxalylchlorid (**76**; 120 µl, 1.40 mmol) wird tropfenweise unter Rühren bei 0 °C zu einer Lösung des in Position 5 entsprechend substituierten 1*H*-Indols **63** bzw. **77** (1.00 mmol) in getrocknetem Diethylether (5 ml) gegeben. Der Ansatz wird bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (1-3 h; dünnschichtchromatographische Kontrolle). Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und mit getrocknetem Diethylether (15 ml) in kleinen Portionen gewaschen. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung weiter verwendet.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N'*-phenylacetohydrazid (**15a**)

Nach AAV 1 aus Phenylhydrazin (100 μ l, 1.01 mmol), Triethylamin (160 μ l, 1.15 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Zweimaliges Umkristallisieren aus Toluol bzw. Ethanol 70% ergibt 64 mg (23%) gelbe Kristalle.

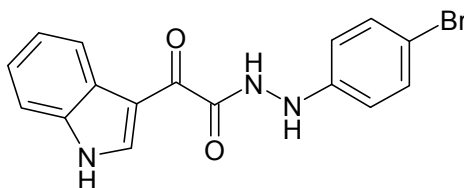
Schmp.: 218-220 °C (Lit.⁸¹: 217-219 °C); IR (KBr): 3364 cm^{-1} und 3305 cm^{-1} (NH), 1701 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.74 (t, 1H, J = 7.4 Hz, ArH), 6.78 (d, 2H, J = 8.3 Hz, ArH), 7.17 (dd, 2H, J = 7.7/7.7 Hz, ArH), 7.27-7.31 (m, 2H, ArH), 7.55-7.57 (m, 1H, ArH), 7.96 (d, 1H, J = 3.0 Hz, ArNH), 8.24-8.26 (m, 1H, ArH), 8.58 (d, 1H, J = 3.1 Hz, ArH), 10.59 (d, 1H, J = 3.0 Hz, CONH), 12.29 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.2 (2C), 112.5, 118.6, 121.1, 122.6, 123.5, 128.7 (2C), 138.0 (tert. C); 112.2, 125.7, 136.3, 148.7, 163.8, 182.4 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (279.29); ber. C 68.81, H 4.69, N 15.05; gef. C 68.22, H 4.52, N 14.86; HPLC: 98.8% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, t_N = 2.35 min, t_M = 1.04 min (ACN/ H_2O ; 45:55), λ_{max} : 233 nm, 265 nm und 328 nm.

N'-(4-Chlorphenyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**15b**)

Nach AAV 2 aus 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (181 mg, 1.01 mmol), Triethylamin (306 μ l, 2.20 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (207 mg, 0.997 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Toluol umkristallisiert. Man erhält 35 mg (11%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 240-241 °C (Lit.⁸¹: 239-240 °C); IR (KBr): 3352 cm⁻¹ und 3283 cm⁻¹ (NH), 1679 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 6.77-6.79 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.20-7.22 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.26-7.31 (m, 2H, ArH), 7.54-7.56 (m, 1H, ArH), 8.11 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, ArNH, Signal wird durch D₂O-Zugabe gelöscht), 8.23-8.25 (m, 1H, ArH), 8.57 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, ArH), 10.61 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, CONH, Signal wird durch D₂O-Zugabe gelöscht), 12.26 (s, 1H, Indol-NH, Signal wird durch D₂O-Zugabe gelöscht); ¹³C-NMR (DMSO *d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.6, 113.7 (2C), 121.1, 122.6, 123.5, 128.5 (2C), 138.1 (tert. C); 112.2, 121.9, 125.8, 136.3, 147.7, 163.8, 182.1 (quart. C); C₁₆H₁₂ClN₃O₂ (313.74); ber. C 61.25, H 3.86, N 13.39; gef. C 61.19, H 3.85, N 13.12; HPLC: 98.8% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm, *t*_N = 4.23 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max}: 243 nm und 328 nm.

N'-(4-Bromphenyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**15c**)

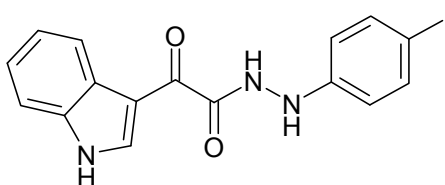


Nach AAV 2 aus 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (557 mg, 2.49 mmol), Triethylamin (765 µl, 5.50 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (521 mg, 2.51 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Toluol bzw. Ethanol 70% erhält man 43 mg (5%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 220-223 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3352 cm⁻¹ und 3283 cm⁻¹ (NH), 1677 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO *d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.72-6.74 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.27-7.31 (m, 2H, ArH), 7.32-7.34 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.55-7.57 (m, 1H, ArH), 8.17 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, ArNH), 8.23-8.25 (m, 1H, ArH), 8.57 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 10.65 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, CONH), 12.29 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.2, 113.8 (2C), 120.7, 122.3, 123.1, 130.9 (2C), 137.7 (tert. C); 109.1, 111.8, 125.4, 135.9, 147.7, 163.4, 181.7 (quart. C); C₁₆H₁₂BrN₃O₂ (358.19); ber. C 53.65, H 3.38, N 11.73; gef. C 53.69, H 3.29,

N 11.35; HPLC: 98.9% bei 254 nm und 97.6% bei 280 nm, $t_N = 2.90$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{\max} : 245 nm und 328 nm.

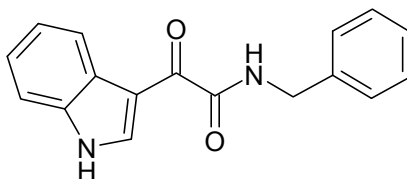
2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N'*-(4-iodphenyl)-2-oxoacetohydrazid (**15d**)



Nach AAV 1 aus 4-Iodphenylhydrazin (226 mg, 0.966 mmol), Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (207 mg, 0.997 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Toluol und anschließend aus Ethanol 70% umkristallisiert. Man erhält 8 mg (2%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 222-228 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3388 cm^{-1} und 3279 cm^{-1} (NH), 1685 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 6.60-6.63 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.27-7.31 (m, 2H, ArH), 7.46-7.48 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.54-7.57 (m, 1H, ArH), 8.16 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, ArNH), 8.22-8.25 (m, 1H, ArH), 8.57 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, ArH), 10.63 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, CONH), 12.29 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.6, 114.7 (2C), 121.1, 122.6, 123.5, 137.0 (2C), 138.1 (tert. C); 80.0, 112.1, 125.7, 136.3, 148.5, 163.7, 182.1 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{IN}_3\text{O}_2$ (405.19); ber. C 47.43, H 2.99, N 10.37; gef. C 47.37, H 3.00, N 9.75; MS (EI): m/z (%) = 405 $[\text{M}]^{+}$ (27); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^{+}$ ber. 404.99747; gef. 404.99763; HPLC: 98.6% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm, $t_N = 3.54$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{\max} : 248 nm und 328 nm.

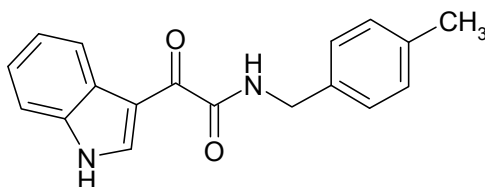
N-Benzyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**16a**)



Nach AAV 1 aus Benzylamin (109 μ l, 1.00 mmol), Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Toluol umkristallisiert. Man erhält 95 mg (34%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 172-174 °C (Lit.¹⁵⁹: 172-173 °C); IR (KBr): 3370 cm^{-1} und 3340 cm^{-1} (NH), 3087 cm^{-1} , 3058 cm^{-1} und 3030 cm^{-1} (CH aromatisch), 2975 cm^{-1} und 2934 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1670 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.43 (d, 2H, J = 6.4 Hz, CH_2), 7.23-7.30 (m, 3H, ArH), 7.33 (m, 2H, ArH), 7.34 (d, 2H, J = 0.8 Hz, ArH), 7.52-7.56 (m, 1H, ArH), 8.22-8.26 (m, 1H, ArH), 8.77 (d, 1H, J = 2.3 Hz, ArH), 9.29 (t, 1H, J = 6.4 Hz, NH), 12.24 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 41.9 (CH_2); 112.5, 121.2, 122.5, 123.4, 126.8, 127.2 (2C), 128.2 (2C), 138.4 (tert. C); 112.1, 126.1, 136.2, 138.9, 163.6, 182.0 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (278.31); ber. C 73.37, H 5.07, N 10.07; gef. C 72.98, H 5.03, N 9.66; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, t_N = 4.22 min, t_M = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 45:55), λ_{max} : 256 nm und 328 nm.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-N-(4-methylbenzyl)-2-oxoacetamid (**16b**)



Methode A

Nach AAV 1 aus 4-Methylbenzylamin (128 μ l, 1.00 mmol), Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (207 mg, 0.997 mmol). Reaktions-

dauer: 1.5 h. Der erhaltene Rückstand wird aus 70%igem Ethanol umkristallisiert. Man erhält 109 mg (37%) hellorange Kristalle.

Schmp.: 186-187 °C (Lit.⁸⁰: 184-186 °C); IR (KBr): 3260 cm⁻¹ (NH), 3091 cm⁻¹ und 3052 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2932 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1648 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.28 (s, 3H, CH₃), 4.39 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 7.13-7.15 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.22-7.24 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.25-7.29 (m, 2H, ArH), 7.51-7.57 (m, 1H, ArH), 8.23-8.27 (m, 1H, ArH), 8.77 (s, 1H, ArH), 9.25 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, NH), 12.25 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 20.7 (CH₃), 41.8 (CH₂); 112.5, 121.3, 122.5, 123.4, 127.3 (2C), 128.8 (2C), 138.4 (tert. C); 112.2, 126.2, 135.9, 136.0, 136.3, 163.6, 182.1 (quart. C); C₁₈H₁₆N₂O₂ (292.33); ber. C 73.95, H 5.52, N 9.58; gef. C 73.84, H 5.66, N 9.74; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, *t*_N = 4.14 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 256 nm und 328 nm.

Methode B

Zu einer Suspension von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem Toluol (5 ml) wird langsam 4-Methylbenzylamin (128 µl, 1.00 mmol) gegeben. Man erhitzt 8 h zum Rückfluss und destilliert anschließend im Vakuum das Lösungsmittel ab. Der zurückbleibende Feststoff wird mit Petrolether gewaschen und aus 70%igem Ethanol umkristallisiert. Man erhält 83 mg (28%) braunes Pulver.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A erhaltenen Verbindung überein.

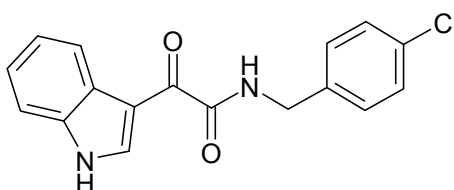
Methode C

Triethylamin (167 µl, 1.20 mmol) wird tropfenweise bei 0 °C unter Rühren zu einer Suspension von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (207 mg, 0.997 mmol) und 4-Methylbenzylamin (140 µl, 1.10 mmol) in getrocknetem Toluol (20 ml) gegeben. Nach Erreichen von Raumtemperatur wird der Ansatz für 24 h gerührt und anschließend filtriert. Der Rückstand wird mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockne eingedunstet und der zurückbleibende Feststoff ebenfalls mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogen-

carbonatlösung und Wasser gewaschen. Die vereinigten Rückstände werden aus Ethanol 70% umkristallisiert. Man erhält 52 mg (18%) hellbraune Kristalle.

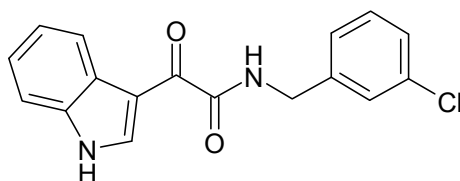
Die analytischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A erhaltenen Verbindung überein.

N-(4-Chlorbenzyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**16c**)



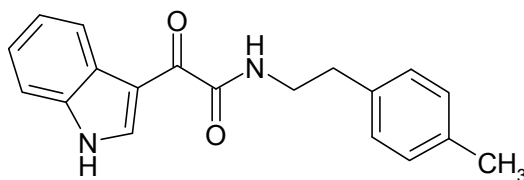
Nach AAV 1 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-Chlorbenzylamin (122 μ l, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 104 mg (33%) hellorange Kristalle.

Schmp.: 204-205 °C (Lit.¹⁵⁹: 205-206 °C); IR (KBr): 3430 cm^{-1} und 3281 cm^{-1} (NH), 1644 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.41 (d, 2H, J = 6.3 Hz, CH_2), 7.25-7.29 (m, 2H, ArH), 7.35-7.36 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.40-7.42 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.53-7.56 (m, 1H, ArH), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.76 (s, 1H, ArH), 9.38 (t, 1H, J = 6.3 Hz, NH), 12.27 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 41.3 (CH_2); 112.5, 121.1, 122.5, 123.4, 128.2 (2C), 129.1 (2C), 138.4 (tert. C); 112.0, 126.0, 131.3, 136.1, 138.0, 163.5, 181.8 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (312.75); ber. C 65.29, H 4.19, N 8.96; gef. C 65.06, H 4.29, N 8.93; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, t_N = 4.39 min, t_M = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 256 nm und 329 nm.

N-(3-Chlorbenzyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (16d)

Nach AAV 1 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 3-Chlorbenzylamin (123 μ l, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 92 mg (29%) hellgelbe Kristalle.

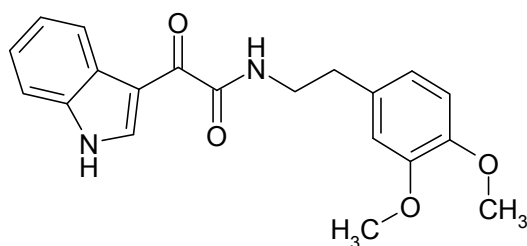
Schmp.: 190-191 °C (Lit.¹⁵⁹: 186-188 °C); IR (KBr): 3300 cm^{-1} und 3243 cm^{-1} (NH), 3092 cm^{-1} und 3070 cm^{-1} (CH aromatisch), 2928 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1661 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.42 (d, 2H, J = 6.4 Hz, CH_2), 7.26-7.28 (m, 2H, ArH), 7.29-7.34 (m, 2H, ArH), 7.37-7.39 (m, 2H, ArH), 7.53-7.56 (m, 1H, ArH), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.77 (s, 1H, ArH), 9.40 (t, 1H, J = 6.4 Hz, NH), 12.28 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 41.4 (CH_2); 112.5, 121.2, 122.5, 123.4, 125.9, 126.7, 127.0, 130.1, 138.4 (tert. C); 112.0, 126.0, 132.8, 136.1, 141.5, 163.6, 181.7 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (312.75); ber. C 65.29, H 4.19, N 8.96; gef. C 65.31, H 4.26, N 8.97; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, t_N = 4.31 min, t_M = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 256 nm und 329 nm.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N*-[2-(4-methylphenyl)ethyl]-2-oxoacetamid (17a)

Nach AAV 1 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (207 mg, 0.997 mmol), 2-(4-Methylphenyl)ethylamin (145 μ l, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 96 mg (31%) hellorange Kristalle.

Schmp.: 209-212 °C (Lit.⁸²: 108 °C); IR (KBr): 3316 cm⁻¹ und 3218 cm⁻¹ (NH), 2934 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1654 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.27 (s, 3H, CH₃), 2.80 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, NHCH₂CH₂), 3.43 (dt, 2H, *J* = 6.1/7.6 Hz, NHCH₂CH₂), 7.10-7.11 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.13-7.14 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.24-7.29 (m, 2H, ArH), 7.52-7.55 (m, 1H, ArH), 8.21-8.24 (m, 1H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 8.79 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH), 12.25 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.6 (CH₃), 34.0 (CH₂), 39.9 (NHCH₂); 112.3, 121.0, 122.3, 123.1, 128.2 (2C), 128.6 (2C), 138.2 (tert. C); 111.8, 125.9, 134.8, 135.8, 136.0, 163.2, 181.9 (quart. C); C₁₉H₁₈N₂O₂ (306.36); ber. C 74.49, H 5.92, N 9.14; gef. C 74.19, H 6.01, N 9.10; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, *t*_N = 3.47 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max}: 256 nm und 327 nm.

N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**17b**)

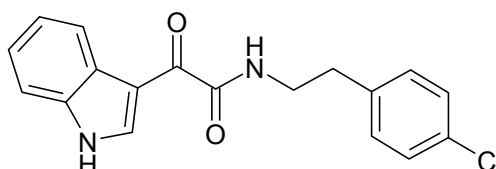


Nach AAV 1 aus 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamin (169 µl, 1.00 mmol), Triethylamin (160 µl, 1.15 mmol) und 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (207 mg, 0.997 mmol). Reaktionsdauer: 30 min. Man erhält nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol 135 mg (38%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 158-159 °C (Lit.¹⁶⁰: 158-159 °C); IR (KBr): 3357 cm⁻¹ und 3281 cm⁻¹ (NH), 2938 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.78 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, NHCH₂CH₂), 3.43 (dt, 2H, *J* = 6.6/7.2 Hz, NHCH₂CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 6.75 (dd, 1H, *J* = 1.9/8.1 Hz, ArH), 6.85 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 6.87 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.24-7.29 (m, 2H, ArH), 7.52-7.55 (m, 1H, ArH), 8.21-8.24 (m, 1H, ArH), 8.71 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, ArH), 8.78 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH), 12.25 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 34.1 (CH₂), 40.1 (NHCH₂); 55.1, 55.3, 111.6, 112.2, 112.4, 120.3, 121.1, 122.4, 123.3, 138.3 (tert. C); 112.0, 126.0, 131.4, 136.1, 147.0, 148.4,

163.3, 182.1 (quart. C); $C_{20}H_{20}N_2O_4$ (352.38); ber. C 68.17, H 5.72, N 7.95; gef. C 67.86, H 5.76, N 7.75; HPLC: 98.9% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, t_N = 3.07 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max} : 268 nm, 257 nm und 327 nm.

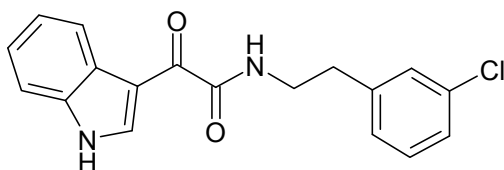
N-[2-(4-Chlorphenyl)ethyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**17c**)



Nach AAV 1 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 2-(4-Chlorphenyl)ethylamin (139 μ l, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 178 mg (33%) farblose Kristalle.

Schmp.: 222-224 °C (Lit.¹⁶⁰: 222-223 °C); IR (KBr): 3300 cm^{-1} und 3253 cm^{-1} (NH), 2933 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1658 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.85 (t, 2H, J = 7.1 Hz, NHCH₂CH₂), 3.47 (dt, 2H, J = 6.4/7.0 Hz, NHCH₂CH₂), 7.25-7.29 (m, 4H, ArH, 2H sind Teil eines AA'XX'-Systems), 7.33-7.37 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.52-7.56 (m, 1H, ArH), 8.21-8.25 (m, 1H, ArH), 8.70 (s, 1H, ArH), 8.79 (t, 1H, J = 5.9 Hz, NH), 12.23 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 34.0 (CH₂), 39.8 (NHCH₂); 112.5, 121.2, 122.5, 123.4, 128.2 (2C), 130.6 (2C), 138.4 (tert. C); 112.1, 126.1, 130.8, 136.2, 138.3, 163.5, 182.1 (quart. C); $C_{18}H_{15}ClN_2O_2$ (326.78); ber. C 66.16, H 4.63, N 8.57; gef. C 66.20, H 4.61, N 8.26; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, t_N = 3.51 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 55:45), λ_{max} : 256 nm und 327 nm.

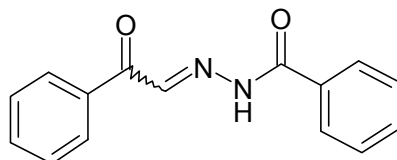
N-[2-(3-Chlorphenyl)ethyl]-2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**17d**)



Nach AAV 1 aus 2-(1H-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 2-(3-Chlorphenyl)ethylamin (139 μ l, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 204 mg (33%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 184-186 °C; IR (KBr): 3347 cm^{-1} und 3190 cm^{-1} (NH), 2938 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1657 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.88 (t, 2H, J = 7.0 Hz, NHCH_2CH_2), 3.50 (dt, 2H, J = 6.4/6.8 Hz, NHCH_2CH_2), 7.21-7.34 (m, 6H, ArH), 7.52-7.57 (m, 1H, ArH), 8.21-8.27 (m, 1H, ArH), 8.67 (s, 1H, ArH), 8.81 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 12.24 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 34.2 (CH_2), 39.2 (NHCH_2); 112.5, 121.2, 122.5, 123.4, 126.1, 127.5, 128.5, 130.1, 138.4 (tert. C); 112.1, 132.9, 136.3, 141.9, 163.6, 182.1 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 672 Scans); $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (326.78); ber. C 66.16, H 4.63, N 8.57; gef. C 65.84, H 4.60, N 8.31; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 98.9% bei 280 nm, t_N = 3.38 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O ; 55:45), λ_{max} : 256 nm und 327 nm.

N'-[2-Oxo-2-phenylethyliden]benzhydrazid (**18a**)

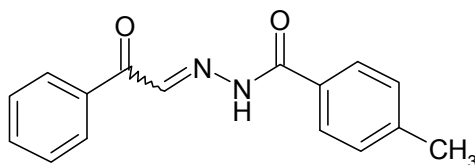


Nach AAV 3 aus Phenylglyoxal-Monohydrat (306 mg, 2.01 mmol) und Benzhydrazid (138 mg, 1.01 mmol) in Ethanol (3 ml). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 84 mg (33%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 166-167 °C (Lit.⁸⁴: 166-167 °C); IR (KBr): 3255 cm^{-1} (NH), 3065 cm^{-1} und 3032 cm^{-1} (CH aromatisch), 1669 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400.1 MHz):

δ (ppm) = 7.57-8.26 (m, 11H, ArH und CH=N, Auswertung aufgrund von Signal-Koaleszenz durch E/Z-Isomerie-Effekte problematisch), 12.40 (s, 1H, NH, Signal wird durch D₂O-Zugabe gelöscht); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 127.9, 128.3 (2C), 128.6 (2C), 129.8 (2C), 132.4, 133.1 (2C), 144.3 (tert. C); 128.7, 135.6, 163.9, 189.7 (quart. C); C₁₅H₁₂N₂O₂ (252.27); ber. C 71.42, H 4.79, N 11.10; gef. C 71.15, H 4.79, N 11.05; HPLC: 95.2% bei 254 nm und 96.9% bei 280 nm, *t*_N = 2.47 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max} : 295 nm.

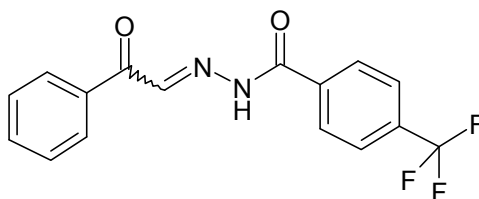
4-Methyl-*N'*-[2-oxo-2-phenylethyliden]benzhydrazid (**18b**)



Nach AAV 3 aus Phenylglyoxal-Monohydrat (306 mg, 2.01 mmol) und 4-Methylbenzhydrazid (151 mg, 1.01 mmol) in 3.0 ml Methanol. Reaktionsdauer: 3 h. Umkristallisation aus Methanol ergibt 45 mg (17%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 158-159 °C (Lit.⁸⁴: 163-165 °C); IR (KBr): 3184 cm⁻¹ (NH), 3036 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1658 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.40 (s, 3H, CH₃), 7.37 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, ArH), 7.55 (dd, 2H, *J* = 7.8/7.8 Hz, ArH), 7.68 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, ArH), 7.84-7.86 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.09-8.10 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23 (br s, 1H, CH=N), 12.30 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 21.0 (CH₃); 127.9, 128.3 (2C), 129.1 (2C), 129.8 (2C), 133.1 (2C), 144.0 (tert. C); 129.5, 135.7, 142.7, 163.7, 189.7 (quart. C); C₁₆H₁₄N₂O₂ (266.30); ber. C 72.16, H 5.30, N 10.52; gef. C 71.81, H 5.38, N 10.45; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, *t*_N = 3.74 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max} : 298 nm und 229 nm.

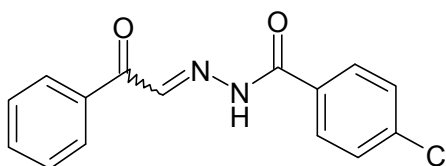
N'-[2-Oxo-2-phenylethyliden]-4-(trifluormethyl)benzhydrazid (**18c**)



Nach AAV 3 aus Phenylglyoxal-Monohydrat (306 mg, 2.01 mmol) und 4-Trifluormethylbenzhydrazid (204 mg, 1.00 mmol) in Ethanol (3 ml). Reaktionsdauer: 5 h. Umkristallisation aus Methanol ergibt 132 mg (41%) gelborange Kristalle.

Schmp.: 205-209 °C; IR (KBr): 3428 cm⁻¹ und 3248 cm⁻¹ (NH), 3043 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1673 cm⁻¹ und 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.38-8.27 (m, 10H, ArH und CH=N, Auswertung aufgrund von Signal-Koaleszenz durch E/Z-Isomerie-Effekte problematisch), 12.55 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 125.6 (q, 2C, ³J_{C,F} = 3.7 Hz, C-C-CF₃), 128.4 (2C), 128.9 (2C), 129.9 (2C), 133.2, 145.1 (tert. C); 123.8 (q, ¹J_{C,F} = 272 Hz, CF₃), 135.6, 136.3, 162.9, 189.6 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 2976 Scans); C₁₆H₁₁F₃N₂O₂ (320.27); ber. C 60.00, H 3.46, N 8.75; gef. C 59.82, H 3.47, N 8.80; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_N = 4.23 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max}: 224 nm, 275 nm und 353 nm.

4-Chlor-*N'*-[2-oxo-2-phenylethyliden]benzhydrazid (**18d**)

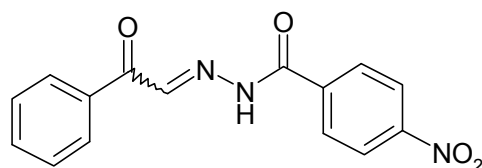


Nach AAV 3 aus Phenylglyoxal-Monohydrat (304 mg, 2.00 mmol) und 4-Chlorbenzhydrazid (171 mg, 1.00 mmol) in Ethanol (3 ml). Reaktionsdauer: 2 h. Umkristallisation aus Ethanol absolut ergibt 126 mg (44%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 196-200 °C; IR (KBr): 3428 cm⁻¹ und 3252 cm⁻¹ (NH), 3068 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1670 cm⁻¹ und 1656 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.50-8.70 (m, 10H, ArH und CH=N, Auswertung aufgrund von Signal-Koaleszenz durch

E/Z-Isomerie-Effekte problematisch), 12.43 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 126.6, 128.4 (2C), 128.7 (2C), 129.2, 129.9 (2C), 133.2 (2C) (tert. C); 131.3, 135.7 (2C), 172.7, 189.6 (quart. C); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (286.71); ber. C 62.84, H 3.87, N 9.77; gef. C 62.68, H 4.00, N 10.04; HPLC: 96.6% bei 254 nm und 96.8% bei 280 nm, t_N = 3.41 min, t_M = 1.02 min (ACN/ H_2O ; 45:55), λ_{max} : 294 nm.

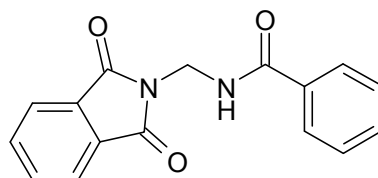
4-Nitro-*N'*-[2-oxo-2-phenylethyliden]benzhydrazid (**18e**)



Nach AAV 3 aus Phenylglyoxal-Monohydrat (305 mg, 2.01 mmol) und 4-Nitrobenzhydrazid (181 mg, 1.00 mmol) in Ethanol (3 ml). Reaktionsdauer: 5 h. Nach dreimaliger Umkristallisation aus Methanol/Toluen (2.5:1), Ethanol 96%/Toluen (4:1) und Ethanol 96% erhält man 62 mg (21%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 244-245 °C (Lit.⁸⁴: 244-246 °C); IR (KBr): 3251 cm^{-1} (NH), 3076 cm^{-1} (CH aromatisch), 1677 cm^{-1} und 1655 cm^{-1} (C=O); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$ (297.27); ber. C 60.61, H 3.73, N 14.14; gef. C 60.79, H 3.68, N 14.19; HPLC: 98.4% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, t_N = 4.79 min, t_M = 1.09 min (ACN/ H_2O ; 40:60), λ_{max} : 295 nm.

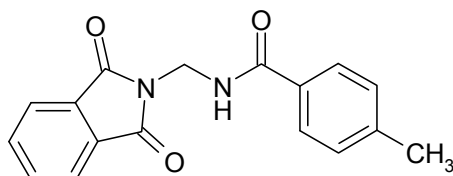
N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]benzamid (**21a**)



Nach AAV 4 aus Benzonitril (100 μl , 0.979 mmol) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (178 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 23 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 178 mg (64%) farblose Kristallnadeln.

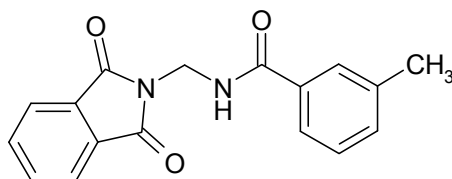
Schmp.: 184-188 °C (Lit.⁸⁵: 184-185 °C); IR (KBr): 3471 cm⁻¹ und 3340 cm⁻¹ (NH), 3083 cm⁻¹, 3053 cm⁻¹ und 3008 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2956 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1775 cm⁻¹, 1716 cm⁻¹ und 1653 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.18 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, CH₂), 7.45-7.47 (m, 2H, ArH), 7.54 (tt, 1H, *J* = 1.3/6.8 Hz, ArH), 7.84-7.86 (m, 2H, ArH), 7.86-7.89 (m, 2H, ArH), 7.92-7.95 (m, 2H, ArH), 9.05 (t, 1H, *J* = 4.7 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 43.2 (CH₂); 123.2 (2C), 127.3 (2C), 128.2 (2C), 131.5, 134.6 (2C) (tert. C); 131.5 (2C), 133.3, 166.0, 167.0 (2C) (quart. C); C₁₆H₁₂N₂O₃ (280.28); ber. C 68.56, H 4.32, N 9.99; gef. C 68.62, H 4.24, N 9.77; HPLC: 99.5% bei 254 nm und 99.9% bei 240 nm, *t*_N = 2.26 min, *t*_M = 1.09 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 297 nm, 394 nm und 376 nm.

N-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]-4-methylbenzamid(**21b**)



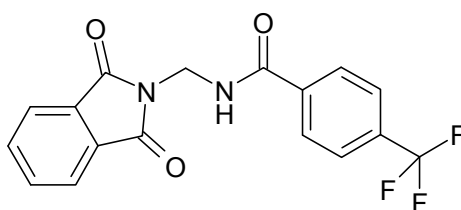
Nach AAV 4 aus 4-Methylbenzonitril (121 mg, 1.03 mmol) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (182 mg, 1.03 mmol). Reaktionsdauer: 21 h. Umkristallisation aus Ethanol 96% ergibt 238 mg (81%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 202-205 °C (Lit.¹⁶¹: 191-192 °C); IR (KBr): 3475 cm⁻¹ und 3315 cm⁻¹ (NH), 3060 cm⁻¹ und 3031 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2956 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1775 cm⁻¹, 1719 cm⁻¹ und 1645 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO *d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.34 (s, 3H, CH₃), 5.16 (d, 2H, *J* = 4.9 Hz, CH₂), 7.25-7.27 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.75-7.76 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.86-7.89 (m, 2H, ArH), 7.91-7.94 (m, 2H, ArH), 8.97 (t, 1H, *J* = 4.9 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.9 (CH₃), 43.2 (CH₂); 123.2 (2C), 127.3 (2C), 128.7 (2C), 134.6 (2C) (tert. C); 130.5, 131.5 (2C), 141.5, 165.8, 167.0 (2C) (quart. C); C₁₇H₁₄N₂O₃ (294.31); ber. C 69.38, H 4.79, N 9.52; gef. C 69.22, H 4.69, N 9.38; HPLC: 98.9% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, *t*_N = 3.61 min, *t*_M = 1.08 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 297 nm, 385 nm und 394 nm.

N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]-3-methylbenzamid (**21c**)

Nach AAV 4 aus 3-Methylbenzonitril (120 μ l, 0.994 mmol) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (180 mg, 1.02 mmol). Reaktionsdauer: 21 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 111 mg (38%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 159-160 °C; IR (KBr): 3428 cm^{-1} und 3330 cm^{-1} (NH), 1776 cm^{-1} , 1702 cm^{-1} und 1652 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.33 (s, 3H, CH₃), 5.16 (d, 2H, J = 5.0 Hz, CH₂), 7.34-7.36 (m, 2H, ArH), 7.63-7.64 (m, 1H, ArH), 7.67 (m, 1H, ArH), 7.86-7.89 (m, 2H, ArH), 7.92-7.95 (m, 2H, ArH), 8.98 (t, 1H, J = 4.9 Hz, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.8 (CH₃), 43.1 (CH₂); 123.2 (2C), 124.5, 127.7, 128.1, 132.1, 134.6 (2C) (tert. C); 131.5 (2C), 133.3, 137.5, 166.0, 167.0 (2C) (quart. C); C₁₇H₁₄N₂O₃ (294.31); ber. C 69.38, H 4.79, N 9.52; gef. C 68.35, H 4.75, N 9.14; MS (EI): m/z (%) = 294 [M]⁺ (5); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 294.10043; gef. 294.09991; HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.4% bei 240 nm, t_N = 3.74 min, t_M = 1.08 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 286 nm, 398 nm und 387 nm.

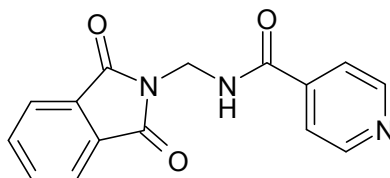
N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]-4-(trifluormethyl)benzamid (**21d**)

Nach AAV 4 aus 4-(Trifluormethyl)benzonitril (171 mg, 1.00 mmol) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (177 mg, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 20 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 322 mg (92%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 219-221 °C; IR (KBr): 3470 cm^{-1} und 3306 cm^{-1} (NH), 3069 cm^{-1} (CH aromatisch), 1774 cm^{-1} , 1714 cm^{-1} und 1652 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz):

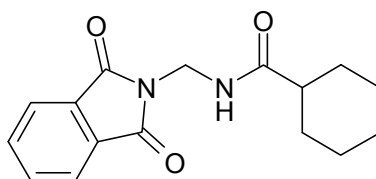
δ (ppm) = 5.21 (d, 2H, J = 5.0 Hz, CH₂), 7.84-7.86 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.87-7.91 (m, 2H, ArH), 7.92-7.96 (m, 2H, ArH), 8.04-8.06 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.28 (t, 1H, J = 5.0 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 43.2 (CH₂); 123.3 (2C), 125.3 (q, 2C, ³ $J_{C,F}$ = 3.6 Hz, C-C-CF₃), 128.3 (2C), 134.7 (2C) (tert. C); 123.9 (q, ¹ $J_{C,F}$ = 272 Hz, CF₃), 131.5 (q, ² $J_{C,F}$ = 32 Hz, C-CF₃), 131.6 (2C), 137.2, 165.0, 167.0 (2C) (quart. C); C₁₇H₁₁F₃N₂O₃ (348.28); ber. C 58.63, H 3.18, N 8.04; gef. C 58.23, H 3.09, N 7.84; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.9% bei 240 nm, t_N = 4.48 min, t_M = 1.07 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max} : 274 nm, 296 nm und 386 nm.

N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]isonicotinamid (**21e**)



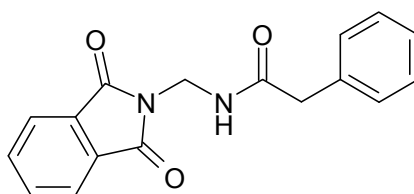
Nach AAV 4 aus Isonicotinonitril (106 mg, 1.02 mmol) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (180 mg, 1.02 mmol). Reaktionsdauer: 15 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 19 mg (7%) farblose Kristallnadeln.

Schmp.: 211-214 °C; IR (KBr): 3423 cm⁻¹ und 3301 cm⁻¹ (NH), 3064 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1773 cm⁻¹, 1715 cm⁻¹ und 1653 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.18 (d, 2H, J = 5.1 Hz, CH₂), 7.75 (dd, 2H, J = 1.6/4.4 Hz, ArH), 7.87-7.90 (m, 2H, ArH), 7.82-7.95 (m, 2H, ArH), 8.73 (dd, 2H, J = 1.6/4.4 Hz, ArH), 9.36 (t, 1H, J = 5.0 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 42.3 (CH₂); 120.5 (2C), 122.6 (2C), 134.0 (2C), 149.5 (2C) (tert. C); 130.8 (2C), 139.6, 163.9, 166.3 (2C) (quart. C); C₁₅H₁₁N₃O₃ (281.27); ber. C 64.05, H 3.94, N 14.94; gef. C 63.13, H 3.86, N 14.13; MS (EI): m/z (%) = 281 [M]⁺ (6); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 281.08005; gef. 281.07996; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 230 nm, t_N = 2.69 min, t_M = 1.06 min (ACN/H₂O; 20:80), λ_{max} : 269 nm, 389 nm und 355 nm.

N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]cyclohexancarboxamid (**21f**)

Nach AAV 4 aus Cyclohexancarbonitril (119 μl , 1.00 mmol) und *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (179 mg, 1.01 mmol). Reaktionsdauer: 18 h. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Ethanol 96% bzw. Toluol erhält man 90 mg (31%) farblose Kristalle.

Schmp.: 203-206 °C; IR (KBr): 3288 cm^{-1} (NH), 3074 cm^{-1} (CH aromatisch), 2928 cm^{-1} und 2846 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1780 cm^{-1} , 1717 cm^{-1} und 1659 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 1.04-1.31 (m, 5H, Cyclohexyl-H), 1.57-1.68 (m, 5H, Cyclohexyl-H), 2.08 (tt, 1H, $J = 3.2/11.3$ Hz, Cyclohexyl-H), 4.93 (d, 2H, $J = 5.4$ Hz, CH_2), 7.85-7.92 (m, 4H, ArH), 8.33 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 25.1 (2C), 25.3, 28.9 (2C), 42.3 (sek. C); 43.5, 123.1 (2C), 134.5 (2C) (tert. C); 131.5 (2C), 166.9 (2C), 175.1 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ (286.33); ber. C 67.12, H 6.34, N 9.78; gef. C 67.13, H 6.28, N 9.67; HPLC: 96.0% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm, $t_N = 3.76$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/ H_2O ; 40:60), λ_{max} : 297 nm, 350 nm und 390 nm.

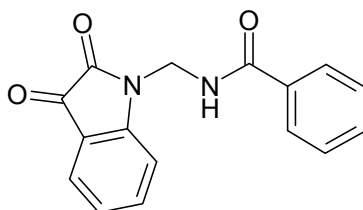
N-[(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]-2-phenylacetamid (**21g**)

Phenylacetonitril (116 μl , 1.00 mmol) wird mit *N*-(Hydroxymethyl)phthalimid (178 mg, 1.00 mmol) in Ameisensäure (3 ml) 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wird diese in Wasser (3 ml) gegossen, wobei es zur Bildung eines weißen Niederschlags kommt, der sich jedoch wieder löst. Man gibt langsam unter Rühren weiter Wasser hinzu bis die Fällung beständig bleibt (insgesamt 15 ml). Nach 30 min

Rühren kann der Niederschlag abgesaugt werden. Anschließend zweimalige Umkristallisation aus 70%igem Ethanol bzw. Toluol ergibt 12 mg (4%) weißes Pulver.

Schmp.: 174-175 °C; IR (KBr): 3492 cm⁻¹ und 3257 cm⁻¹ (NH), 3059 cm⁻¹ und 3027 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1786 cm⁻¹, 1724 cm⁻¹ und 1640 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.41 (s, 2H, CH₂), 4.96 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, CH₂), 7.18-7.22 (m, 3H, ArH), 7.25-7.28 (m, 2H, ArH), 7.85-7.88 (m, 2H, ArH), 7.90-7.93 (m, 2H, ArH), 8.76 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 41.7, 42.1 (sek. C); 123.2 (2C), 126.3, 128.1 (2C), 128.9 (2C), 134.6 (2C) (tert. C); 131.3 (2C), 135.8, 166.9 (2C), 170.0 (quart. C); C₁₇H₁₄N₂O₃ (294.31); MS (EI): *m/z* (%) = 294 [M]⁺ (7); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 294.10043; gef. 294.10013; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.9% bei 230 nm, *t*_N = 3.71 min, *t*_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 35:65), λ_{max}: 297 nm, 355 nm und 369 nm.

N-[(2,3-Dioxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-1-yl)methyl]benzamid (**22**)

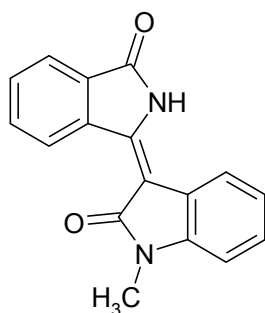


N-[(Dimethylamino)methyl]benzamid (**45**; 230 mg, 1.29 mmol) und 1*H*-Indol-2,3-dion (192 mg, 1.30 mmol) werden unter Zusatz von gepulvertem Natriumhydroxid (130 mg, 3.25 mmol) in Toluol (7 ml) unter Stickstoffbegasung 3 h zum Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen der Lösung bildet sich ein gelbbrauner Niederschlag, der abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält 73 mg (20%) orange Kristalle (Lit.⁸⁷: 75%).

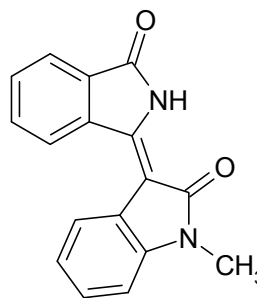
Schmp.: 186-187 °C (Lit.⁸⁷: 186 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.28 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, CH₂), 7.16 (ddd, 1H, *J* = 0.7/7.5/7.5 Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.46-7.48 (m, 2H, ArH), 7.55 (tt, 1H, *J* = 1.3/7.4 Hz, ArH), 7.60 (dd, 1H, *J* = 0.8/7.4 Hz, ArH), 7.70 (ddd, 1H, *J* = 1.4/7.9/7.9 Hz, ArH), 7.87-7.88 (m, 2H, ArH), 9.24 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 44.6 (CH₂); 111.6, 123.4, 124.4, 127.3 (2C), 128.3 (2C), 131.7, 138.2 (tert. C); 117.4, 133.1, 149.8,

157.9, 166.7, 183.2 (quart. C); HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_N = 2.60 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{\max} : 240 nm und 302 nm.

1-Methyl-3-(3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-1-yliden)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on (**23a**)



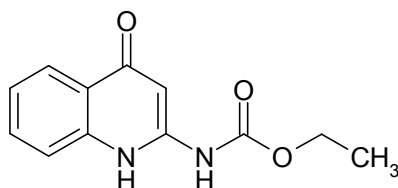
E-Isomer



Z-Isomer

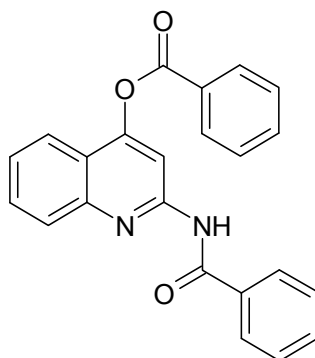
Eine Mischung aus Monothiophthalimid (**47**; 34 mg, 0.208 mmol) und *N*-Methyl-2-oxindol (30 mg, 0.204 mmol) wird unter Zusatz von Piperidin (1 Tropfen) in Ethanol (2.5 ml) 1 h zum Rückfluss erhitzt. Es kommt zur Bildung eines roten Niederschlags, der nach dem Abkühlen abgesaugt und aus Eisessig umkristallisiert werden kann. Man erhält 22 mg (40%) rote Kristalle.

Schmp.: 250-257 °C (Lit.⁹⁴: 242 °C); IR (KBr): 3431 cm⁻¹ und 3345 cm⁻¹ (NH), 1731 cm⁻¹ und 1679 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 3.25 (s, 3H, CH₃), 7.03 (d, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 7.07 (dd, 1H, J = 7.2/7.2 Hz, ArH), 7.31 (dd, 1H, J = 7.6/7.6 Hz, ArH), 7.73 (dd, 1H, J = 7.2/7.2 Hz, ArH), 7.81 (ddd, 1H, J = 1.3/7.5/7.5 Hz, ArH), 7.88 (ddd, 1H, J = 0.5/7.4/7.4 Hz, ArH), 7.99 (d, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 9.58 (d, 1H, J = 8.0 Hz, ArH), 10.70 (s, 1H, NH); doppelter Signalsatz (E/Z = 5:1); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 25.6 (CH₃); 107.9, 121.4, 122.9, 123.5, 128.2, 128.5, 131.6, 133.3 (tert. C); 119.7, 120.8, 129.1, 135.2, 141.5, 142.4, 166.2, 168.9 (quart. C); doppelter Signalsatz (E/Z = 5:1) C₁₇H₁₂N₂O₂ (276.29); MS (EI): m/z (%) = 276 [M]⁺ (100); ber. C 73.90, H 4.38, N 10.14; gef. C 73.45, H 4.25, N 9.84; HPLC: 97.9% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm, t_N = 2.71 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{\max} : 367 nm und 283 nm.

Ethyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-2-ylcarbamat (**24a**)

Zu einer im Eisbad gekühlten Suspension von 2-Amino-4(1*H*)-chinolinon (160 mg, 1.00 mmol; 3 h bei 125 °C getrocknet) in getrocknetem Pyridin (3 ml) wird tropfenweise Ethylchlorformiat (258 μ l, 2.70 mmol) gegeben. Nach dreißigminütigem Rühren bei 2-5 °C wird der Ansatz für 4 Tage in den Kühlschrank gestellt. Der sich gebildete weiße Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 62 mg (27%) farblose Kristalle.

Schmp.: 252-255 °C (Lit.⁹⁶: 252-254 °C); IR (KBr): 3198 cm^{-1} und 3114 cm^{-1} (NH), 3049 cm^{-1} (CH aromatisch), 2979 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} und 2872 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1743 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (Pyridin- d_5 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.18 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH_3), 4.22 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH_2), 7.43 (dd, 1H, J = 7.4/7.4 Hz, ArH), 7.59 (m, 2H, ArH), 7.66 (dd, 1H, J = 7.4/7.4 Hz, ArH), 7.96 (br s, 1H, NH), 8.68 (d, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 12.24 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 14.4 (CH_3), 61.8 (OCH_2); 95.7, 118.5, 123.2, 124.6, 131.6 (tert. C); 124.4, 138.1, 146.5, 153.7, 176.6 (quart. C); $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ (232.24); ber. C 62.06, H 5.21, N 12.06; gef. C 62.23, H 5.33, N 12.10; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, t_N = 2.25 min, t_M = 1.04 min (ACN/ H_2O ; 30:70), λ_{max} : 242 nm, 299 nm und 391 nm.

(2-Benzoylaminochinolin-4-yl)benzoat (**61**)

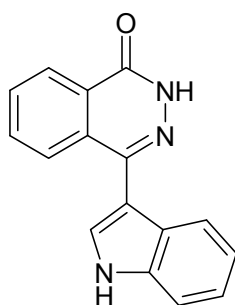
Zu einer im Eisbad gekühlten Suspension von 2-Amino-4(1*H*)-chinolinon (161 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem Pyridin (3 ml) wird tropfenweise Benzoylchlorid (232 μ l, 2.00 mmol) gegeben. Nach dreißigminütigem Rühren bei 1-9 °C wird die Mischung für 24 h in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wird der Ansatz unter Rühren langsam mit Wasser auf ein Endvolumen von 40 ml verdünnt und für weitere 24 h stehen gelassen. Der sich gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol 70% umkristallisiert. Man erhält 128 mg (35%) farblose Kristalle.

Schmp.: 152-156 °C; IR (KBr): 3429 cm^{-1} (NH), 1736 cm^{-1} und 1676 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.54-7.56 (m, 2H, ArH), 7.57-7.60 (m, 1H, ArH), 7.64 (tt, 1H, $J = 1.2/6.8$ Hz, ArH), 7.69-7.72 (m, 2H, ArH), 7.82-7.87 (m, 2H, ArH), 7.97 (dd, 1H, $J = 1.0/8.3$ Hz, ArH) überlagert mit 7.99 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 8.10-8.12 (m, 2H, ArH), 8.31-8.32 (m, 2H, ArH), 8.46 (s, 1H, ArH), 11.43 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 107.8, 121.4, 125.8, 127.3, 128.2 (2C), 128.3 (2C), 129.2 (2C), 130.1 (2C), 130.9, 132.2, 134.6 (tert. C); 120.0, 127.9, 133.6, 147.5, 152.4, 155.0, 163.8, 166.6 (quart. C); $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (368.39); ber. C 74.99, H 4.38, N 7.60; gef. C 74.59, H 4.18, N 7.60; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, $t_N = 2.71$ min, $t_M = 1.10$ min (ACN/ H_2O ; 70:30), λ_{max} : 257 nm, 238 nm und 319 nm.

Der Versuch einer Hydrolyse von **61** wurde mit dem Ziel unternommen, den Ester in Position 4 selektiv zu spalten, um eine zu **24a** analoge Verbindung zu erhalten. **61** wurde in einer Mischung aus Ethanol und Pyridin gelöst und 10 min refluxiert. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte jedoch keinerlei Umsetzung, so dass zusätzlich 1M Natronlauge hinzu gegeben wurde. Zwar führte dies offensichtlich zu einer Spaltung, es gelang jedoch nicht, die dabei entstandenen Produkte zu isolieren. Auch

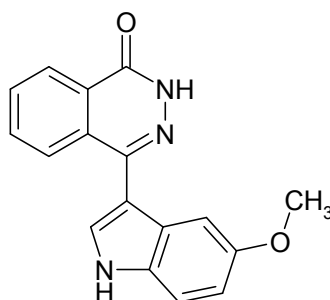
weitere Hydrolyse-Versuche, bei denen bezüglich der zu spaltenden Verbindung äquimolare Mengen an 1M Natronlauge eingesetzt wurden und die Temperatur langsam von 30 °C auf 80 °C bis zum Verschwinden des Eduktflecks auf dem Dünnschichtchromatogramm erhöht wurde, führten nicht zum Erfolg. Es gelang in keinem Fall, das gewünschte einfach substituierte Produkt **24b** zu gewinnen.

4-(1*H*-Indol-3-yl)phthalazin-1(2*H*)-on (**25a**)



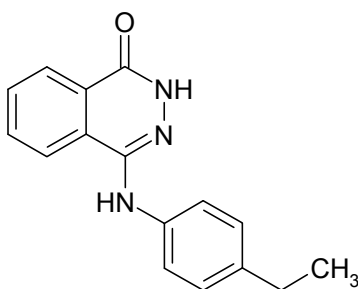
Nach AAV 5 aus 1-Chlor-4-(1*H*-indol-3-yl)phthalazin (**64a**; 164 mg, 0.587 mmol) und Natriumacetat (96 mg, 1.2 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 66 mg (43%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 322-324 °C (Zersetzung; Lit.⁹⁷: 210-212 °C); IR (KBr): 3299 cm⁻¹ und 3148 cm⁻¹ (NH), 3094 cm⁻¹ und 3038 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2988 cm⁻¹, 2931 cm⁻¹ und 2889 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1651 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.08 (ddd, 1H, *J* = 0.8/7.9/7.9 Hz, ArH), 7.20 (ddd, 1H, *J* = 0.8/7.8/7.8 Hz, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.66 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.83 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.87-7.94 (m, 2H, ArH), 8.02-8.05 (m, 1H, ArH), 8.36-8.38 (m, 1H, ArH), 11.63 (s, 1H, NH), 12.76 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 111.9, 119.7, 119.9, 121.8, 126.0, 126.6, 126.8, 131.3, 133.4 (tert. C); 109.7, 126.3, 128.0, 129.8, 136.1, 142.0, 159.0 (quart. C); C₁₆H₁₁N₃O (261.28); ber. C 73.55, H 4.24, N 16.08; gef. C 73.92, H 4.15, N 15.86; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, *t*_N = 2.00 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 272 nm und 312 nm.

4-(5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)phthalazin-1(2*H*)-on (25b)

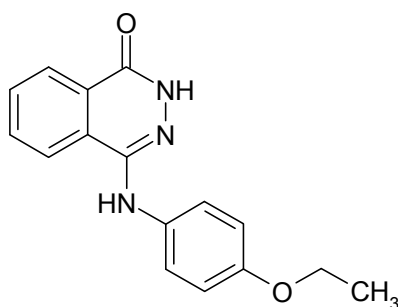
Nach AAV 5 aus 1-Chlor-4-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)phthalazin (**64b**; 164 mg, 0.529 mmol) und Natriumacetat (89 mg, 1.1 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96%/Toluen (3.5:1) umkristallisiert. Man erhält 112 mg (72%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 313-318 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3226 cm⁻¹, 3194 cm⁻¹ und 3152 cm⁻¹ (NH), 3091 cm⁻¹ und 3016 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2994 cm⁻¹, 2941 cm⁻¹ und 2897 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1642 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.70 (s, 3H, OCH₃), 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.5/8.8 Hz, ArH), 7.13 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 7.77 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 7.89 (ddd, 1H, *J* = 1.4/7.9/7.9 Hz, ArH), 7.93 (ddd, 1H, *J* = 1.5/7.2/7.2 Hz, ArH), 8.03-8.04 (m, 1H, ArH), 8.36 (dd, 1H, *J* = 1.5/7.9 Hz, ArH), 11.50 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, NH), 12.74 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 54.6 (OCH₃); 100.9, 111.5, 112.0, 125.4, 126.2, 126.5, 130.8, 132.9 (tert. C); 108.9, 126.1, 127.4, 129.2, 130.6, 141.6, 153.3, 158.4 (quart. C); C₁₇H₁₃N₃O₂ (291.30); ber. C 70.09, H 4.50, N 14.42; gef. C 70.25, H 4.53, N 14.24; HPLC: 99.5% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, *t*_N = 1.94 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 35:65), λ_{max}: 270 nm und 297 nm.

4-(4-Ethylanilino)phthalazin-1(2H)-on (26a)

Nach AAV 5 aus 4-Chlor-*N*-(4-ethylphenyl)-1-phthalazinamin (**69a**; 198 mg, 0.698 mmol) und Natriumacetat (116 mg, 1.41 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Der erhaltene Rückstand wird zweimal aus Toluol umkristallisiert. Man erhält 49 mg (26%) hellgelbe Kristalle.

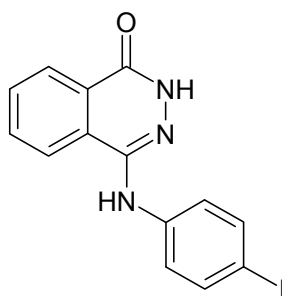
Schmp.: 226-228 °C; IR (KBr): 3430 cm⁻¹ und 3318 cm⁻¹ (NH), 3012 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2962 cm⁻¹, 2928 cm⁻¹ und 2870 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1642 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.17 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz, CH₃), 2.56 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 7.11-7.14 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.51-7.53 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.88 (ddd, 1H, *J* = 0.9/7.9/7.9 Hz, ArH), 7.98 (ddd, 1H, *J* = 1.4/7.4/7.4 Hz, ArH), 8.29 (dd, 1H, *J* = 1.4/8.0 Hz, ArH), 8.36 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 8.52 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 15.8 (CH₃), 27.5 (CH₂); 119.6 (2C), 123.4, 126.2, 127.6 (2C), 131.4, 132.9 (tert. C); 125.4, 128.4, 136.4, 139.0, 142.2, 157.9 (quart. C); C₁₆H₁₅N₃O (265.31); ber. C 72.43, H 5.70, N 15.84; gef. C 72.32, H 5.71, N 15.93; HPLC: 99.5% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, *t*_N = 3.32 min, *t*_M = 1.07 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max}: 251 nm, 326 nm und 294 nm.

4-(4-Ethoxyanilino)phthalazin-1(2H)-on (26b)

Nach AAV 5 aus 4-Chlor-*N*-(4-ethoxyphenyl)-1-phthalazinamin (**69b**; 270 mg, 0.901 mmol) und Natriumacetat (150 mg, 1.83 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Toluol umkristallisiert. Man erhält 125 mg (49%) hellgelbes kristallines Pulver.

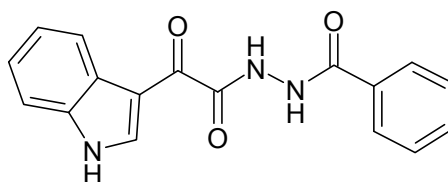
Schmp.: 235-238 °C; IR (KBr): 3315 cm⁻¹ und 3154 cm⁻¹ (NH), 2977 cm⁻¹, 2936 cm⁻¹ und 2906 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1643 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.32 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 3.99 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH₂), 6.87-6.89 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.50-7.52 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.88 (dd, 1H, *J* = 7.9/7.9 Hz, ArH), 7.98 (ddd, 1H, *J* = 1.3/8.4/8.4 Hz, ArH), 8.29 (dd, 1H, *J* = 0.8/7.9 Hz, ArH), 8.36 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 8.43 (s, 1H, NH), 11.79 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 13.5 (CH₃), 61.8 (OCH₂); 113.0 (2C), 120.4 (2C), 122.1, 125.1, 130.1, 131.7 (tert. C); 124.1, 127.1, 133.0, 141.3, 152.2, 156.7 (quart. C); C₁₆H₁₅N₃O₂ (281.31); ber. C 68.31, H 5.37, N 14.94; gef. C 67.86, H 5.39, N 15.01; MS (EI): *m/z* (%) = 281 [M]⁺ (80); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 280.10858; gef. 280.10865; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 95.7% bei 280 nm, *t*_N = 2.54 min, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 249 nm, 328 nm und 296 nm.

4-(4-Iodanilino)phthalazin-1(2H)-on (**26c**)



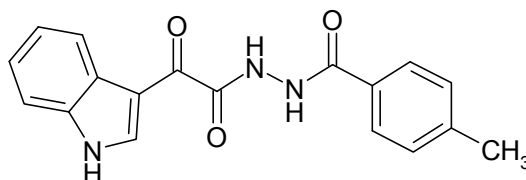
Nach AAV 5 aus 4-Chlor-*N*-(4-iodphenyl)-1-phthalazinamin (**69c**; 46 mg, 0.12 mmol) und Natriumacetat (22 mg, 0.27 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Toluol umkristallisiert. Man erhält 21 mg (48%) gelbes Pulver.

Schmp.: 280-281 °C; IR (KBr): 3430 cm⁻¹ (NH), 2985 cm⁻¹, 2949 cm⁻¹ und 2882 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1656 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.46-7.49 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.59-7.61 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.89 (ddd, 1H, *J* = 0.9/7.9/7.9 Hz, ArH), 7.99 (ddd, 1H, *J* = 1.4/8.0/8.0 Hz, ArH), 8.29 (dd, 1H, *J* = 1.2/7.9 Hz, ArH), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 8.75 (s, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 121.1 (2C), 123.4, 126.3, 131.6, 133.0, 136.9 (2C) (tert. C); 83.3, 125.3, 128.4, 141.4, 141.5, 158.0 (quart. C); C₁₄H₁₀IN₃O (363.15); ber. C 46.30, H 2.78, N 11.57; gef. C 46.44, H 2.67, N 10.93; MS (EI): *m/z* (%) = 363 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 361.97903; gef. 361.97757; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, *t*_N = 3.76 min, *t*_M = 1.07 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max}: 260 nm und 323 nm.

N'-Benzoyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**27a**)

Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), Benzhydrazid (137 mg, 1.01 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 2.5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 91 mg (30%) hellgelbe Kristalle.

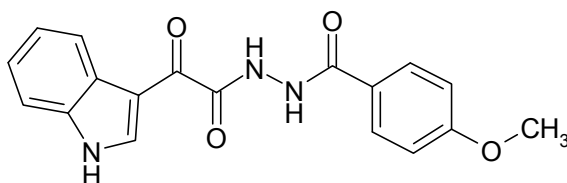
Schmp.: 305-309 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3300 cm^{-1} (NH), 1710 cm^{-1} und 1639 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.27-7.33 (m, 2H, ArH), 7.52-7.57 (m, 2H, ArH) überlagert mit 7.57-7.59 (m, 1H, ArH) überlagert mit 7.62 (tt, 1H, J = 1.3/6.2 Hz, ArH), 7.94-7.97 (m, 2H, ArH), 8.23-8.28 (m, 1H, ArH), 8.72 (d, 1H, J = 3.1 Hz, ArH), 10.57 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH), 12.33 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 112.6, 121.2, 122.7, 123.7, 127.5 (2C), 128.5 (2C), 132.0, 138.5 (tert. C); 112.7, 125.7, 132.3, 136.5, 163.7, 165.5, 182.4 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ (307.30); ber. C 66.44, H 4.26, N 13.67; gef. C 66.25, H 4.19, N 13.45; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_N = 4.19 min, t_M = 1.09 min (ACN/ H_2O ; 30:70), λ_{max} : 330 nm.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N'*-(4-methylbenzoyl)-2-oxoacetohydrazid (**27b**)

Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-Methylbenzhydrazid (150 mg, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 77 mg (24%) farblose Kristalle.

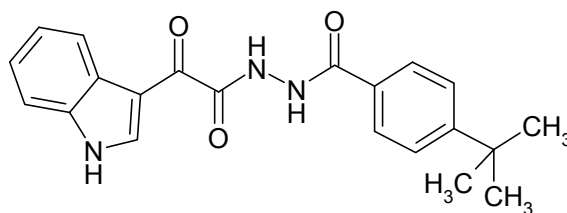
Schmp.: 301-305 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3301 cm⁻¹ und 3147 cm⁻¹ (NH), 3057 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2916 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1709 cm⁻¹ und 1638 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.28-7.32 (m, 2H, ArH), 7.34-7.35 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 7.84-7.85 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.25 (m, 1H, ArH), 8.72 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, ArH), 10.51 (s, 1H, NH), 10.70 (s, 1H, NH), 12.35 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 20.1 (CH₃); 111.7, 120.2, 121.8, 122.7, 126.5 (2C), 128.1 (2C), 137.6 (tert. C); 111.6, 124.7, 128.5, 135.5, 141.1, 162.7, 164.4, 181.5 (quart. C); C₁₈H₁₅N₃O₃ (321.33); ber. C 67.28, H 4.71, N 13.08; gef. C 67.64, H 4.78, N 12.98; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_N = 2.43 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max}: 246 nm und 329 nm.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N'*-(4-methoxybenzoyl)-2-oxoacetohydrazid (**27c**)



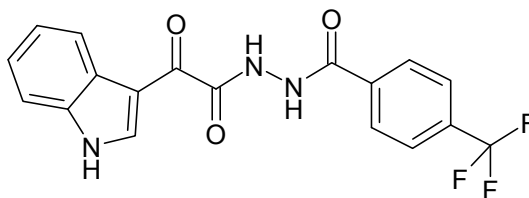
Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-Methoxybenzhydrazid (167 mg, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 µl, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 23 h. Nach Aufkochen in Ethanol 96% erhält man 81 mg (24%) gelbes Pulver.

Schmp.: 300-305 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3284 cm⁻¹ (NH), 1679 cm⁻¹ und 1644 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 3.84 (s, 3H, OCH₃), 7.06-7.08 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.27-7.32 (m, 2H, ArH), 7.56-7.58 (m, 1H, ArH), 7.92-7.94 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.72 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, ArH), 10.41 (s, 1H, NH), 10.63 (s, 1H, NH), 12.32 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH₃); 112.7, 113.8 (2C), 121.2, 122.7, 123.6, 129.4 (2C), 138.5 (tert. C); 112.6, 124.4, 125.7, 136.5, 162.1, 163.8, 165.0, 182.5 (quart. C); C₁₈H₁₅N₃O₄ (337.33); ber. C 64.09, H 4.48, N 12.46; gef. C 63.98, H 4.54, N 12.47; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, *t*_N = 5.12 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 30:70), λ_{max}: 258 nm und 329 nm.

N'-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**27d**)

Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (196 mg, 1.02 mmol) und Triethylamin (160 μ l, 1.15 mmol). Reaktionsdauer: 22 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 205 mg (56%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 270-271 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3340 cm^{-1} , 3277 cm^{-1} und 3158 cm^{-1} (NH), 2952 cm^{-1} , 2903 cm^{-1} und 2867 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1694 cm^{-1} und 1653 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.32 (s, 9H, CH_3), 7.27-7.33 (m, 2H, ArH), 7.55-7.56 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems) überlagert mit 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 7.87-7.89 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.72 (s, 1H, ArH), 10.51 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH), 12.35 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 (3x CH_3); 112.6, 121.1, 122.6, 123.6, 125.2 (2C), 127.3 (2C), 138.5 (tert. C); 34.6, 112.5, 125.6, 129.4, 136.4, 154.8, 163.6, 165.3, 182.4 (quart. C); $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ (363.41); ber. C 69.41, H 5.82, N 11.56; gef. C 69.17, H 5.70, N 11.39; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, t_N = 2.97 min, t_M = 1.01 min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 246 nm und 329 nm.

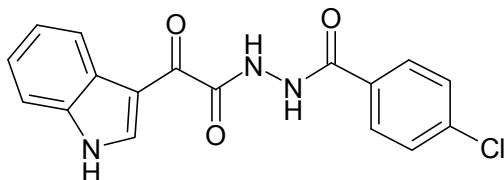
2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N'*-[4-(trifluormethyl)benzoyl]acetohydrazid (**27e**)

Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-(Trifluormethyl)benzhydrazid (205 mg, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol).

Reaktionsdauer: 6.5 h. Der erhaltene Rückstand wird aus einem Ethanol 96%/Toluen-Gemisch (1:1) umkristallisiert. Man erhält 147 mg (39%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 325-330 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3359 cm⁻¹ und 3293 cm⁻¹ (NH), 1709 cm⁻¹ und 1645 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.28-7.33 (m, 2H, ArH), 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 7.94-7.96 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.12-8.14 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.71 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, ArH), 10.85 (s, 2H, 2xNH), 12.37 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 111.5, 119.9, 121.5, 122.4, 124.4 (q, 2C, ³*J*_{C,F} = 3.6 Hz, C-C-CF₃), 127.2 (2C), 137.3 (tert. C); 111.2, 122.6 (q, ¹*J*_{C,F} = 273 Hz, CF₃), 124.5, 130.5 (q, ²*J*_{C,F} = 32 Hz, C-CF₃), 134.8, 135.2, 162.2, 163.1, 180.8 (quart. C); C₁₈H₁₂F₃N₃O₃ (375.30); ber. C 57.61, H 3.22, N 11.20; gef. C 57.59, H 3.14, N 10.86; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, *t*_N = 2.55 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 45:55), λ_{max}: 254 nm und 331 nm.

N'-(4-Chlorbenzoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**27f**)

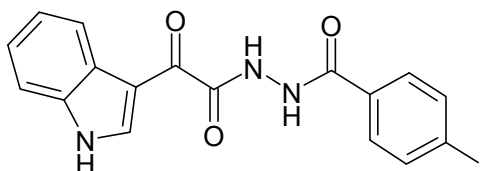


Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-Chlorbenzhydrazid (174 mg, 1.02 mmol) und Triethylamin (153 µl, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Der erhaltene Rückstand wird aus einem Ethanol 70%/Toluen-Gemisch (3:1) umkristallisiert. Man erhält 38 mg (11%) farblose Kristalle.

Schmp.: 320-328 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3295 cm⁻¹ und 3147 cm⁻¹ (NH), 3067 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1709 cm⁻¹ und 1641 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.28-7.32 (m, 2H, ArH), 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 7.62-7.65 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.94-7.97 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.70 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz, ArH), 10.69 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH), 12.36 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 112.6, 121.1, 122.7, 123.6, 128.6 (2C), 129.3 (2C), 138.4 (tert. C); 112.4, 125.6, 130.9, 136.4, 136.8,

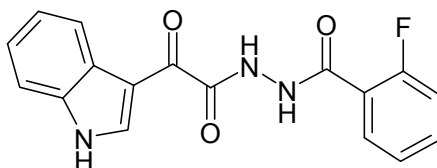
163.4, 164.4, 182.1 (quart. C); $C_{17}H_{12}ClN_3O_3$ (341.75); ber. C 59.75, H 3.54, N 12.30; gef. C 59.68, H 3.53, N 12.07; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, t_N = 3.23 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 245 nm und 330 nm.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N'*-(4-iodbenzoyl)-2-oxoacetohydrazid (**27g**)



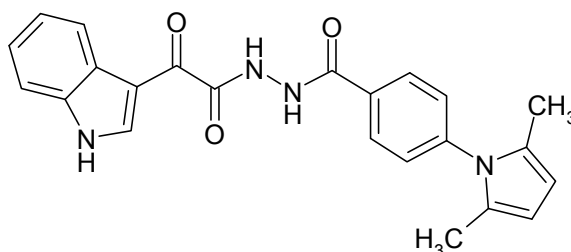
Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (99 mg, 0.48 mmol), 4-Iodbenzhydrazid (114 mg, 0.435 mmol) und Triethylamin (75 μ l, 0.54 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Nach Aufkochen in Ethanol 96%/Toluen (5:1) erhält man 77 mg (40%) hellgelbes Pulver.

Schmp.: 345-348 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3338 cm^{-1} , 3294 cm^{-1} und 3147 cm^{-1} (NH), 1709 cm^{-1} und 1635 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.27-7.32 (m, 2H, ArH), 7.55-7.59 (m, 1H, ArH), 7.70-7.72 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.92-7.95 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.22-8.25 (m, 1H, ArH), 8.68 (d, 1H, J = 3.2 Hz, ArH), 10.62 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH), 12.30 (d, 1H, J = 2.7 Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 112.6, 121.1, 122.6, 123.5, 129.3 (2C), 137.4 (2C), 138.3 (tert. C); 99.6, 112.5, 125.6, 131.7, 136.4, 163.4, 164.8, 182.1 (quart. C); $C_{17}H_{12}IN_3O_3$ (433.20); ber. C 47.13, H 2.79, N 9.70; gef. C 47.20, H 2.66, N 9.41; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm, t_N = 4.15 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O; 40:60), λ_{max} : 257 nm und 330 nm.

N'-(2-Fluorbenzoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**27h**)

Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 2-Fluorbenzhydrazid (154 mg, 1.00 mmol) und Triethylamin (153 μ l, 1.10 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Nach Umkristallisieren aus Ethanol 96% erhält man 103 mg (32%) gelbgrüne Kristalle.

Schmp.: 271-275 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3376 cm^{-1} , 3298 cm^{-1} und 3145 cm^{-1} (NH), 1709 cm^{-1} und 1639 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.27-7.32 (m, 2H, ArH), 7.34-7.38 (m, 2H, ArH), 7.55-7.64 (m, 2H, ArH), 7.70 (ddd, 1H, $J = 2.7/7.1/7.1$ Hz, ArH), 8.22-8.26 (m, 1H, ArH), 8.70 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, ArH), 10.39 (s, 1H, NH), 10.76 (s, 1H, NH), 12.33 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz): δ (ppm) = 112.6, 116.3 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 22$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}$), 121.2, 122.6, 123.6, 124.5 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 3.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}$), 130.1 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 2.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-CF}$), 133.1 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 9.0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}$), 138.4 (tert. C); 112.5, 122.0 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 14$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}$), 125.7, 136.4, 159.2 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 250$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}$), 163.0, 163.2, 182.1 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_3$ (325.29); ber. C 62.77, H 3.72, N 12.92; gef. C 62.71, H 3.70, N 12.77; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 2.95$ min, $t_{\text{M}} = 1.03$ min (ACN/ H_2O ; 35:65), λ_{max} : 254 nm, 266 nm und 330 nm.

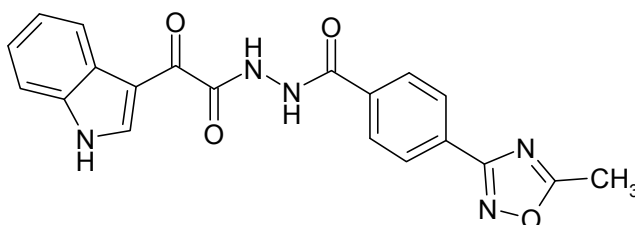
N'-[4-(2,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)benzoyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**27i**)

Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (208 mg, 1.00 mmol), 4-(2,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)benzhydrazid (228 mg, 0.994 mmol) und Triethylamin (153 μ l,

1.10 mmol). Reaktionsdauer: 24 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 211 mg (53%) oranges Pulver.

Schmp.: 279-282 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3295 cm⁻¹ und 3148 cm⁻¹ (NH), 2921 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1709 cm⁻¹ und 1636 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.02 (s, 6H, CH₃), 5.85 (s, 2H, Pyrrol-H), 7.27-7.33 (m, 2H, ArH), 7.43-7.46 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.56-7.60 (m, 1H, ArH), 8.04-8.08 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.27 (m, 1H, ArH), 8.71 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, ArH), 10.66 (s, 1H, NH), 10.76 (s, 1H, NH), 12.32 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 12.8 (2xCH₃); 106.5 (2C), 112.6, 121.2, 122.7, 123.6, 128.0 (2C), 128.5 (2C), 138.4 (tert. C); 112.6, 125.7, 127.5 (2C), 131.3, 136.5, 141.4, 163.6, 164.8, 182.2 (quart. C); C₂₃H₂₀N₄O₃ (400.43); ber. C 68.99, H 5.03, N 13.99; gef. C 68.74, H 4.85, N 13.80; HPLC: 96.1% bei 254 nm und 96.1% bei 280 nm, *t*_N = 2.68 min, *t*_M = 1.01 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 267 nm und 328 nm.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N'*-[4-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzoyl]-2-oxoacetohydrazid (**27j**)

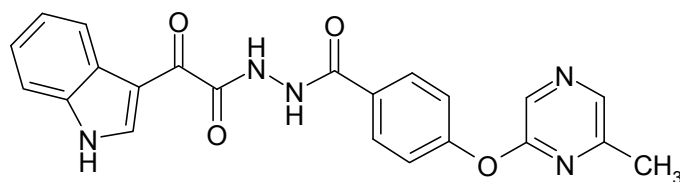


Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (104 mg, 0.501 mmol), 4-(5-Methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzhydrazid (**70b**; 109 mg, 0.500 mmol) und Triethylamin (77 µl, 0.55 mmol). Reaktionsdauer: 26 h. Nach Aufkochen in Ethanol 96%/Toluen (1:1) erhält man 97 mg (50%) gelbes Pulver.

Schmp.: 312-317 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3302 cm⁻¹ und 3146 cm⁻¹ (NH), 1708 cm⁻¹ und 1647 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.71 (s, 3H, CH₃), 7.28-7.33 (m, 2H, ArH), 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 8.10-8.11 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.16-8.17 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.24-8.26 (m, 1H, ArH), 8.72 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, ArH), 10.77 (s, 1H, NH), 10.82 (s, 1H, NH), 12.36 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 12.0 (CH₃); 112.6, 121.1, 122.7, 123.6, 127.1 (2C), 128.3 (2C), 138.4 (tert. C); 112.4, 125.6, 129.2,

134.6, 136.4, 163.4, 164.7, 166.9, 177.8, 182.1 (quart. C); C₂₀H₁₅N₅O₄ (389.36); ber. C 61.69, H 3.88, N 17.99; gef. C 59.27, H 3.60, N 16.70; MS (EI): m/z (%) = 389 [M]⁺ (4); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 389.11243; gef. 389.11181; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, t_N = 3.50 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 35:65), λ_{max}: 256 nm und 330 nm.

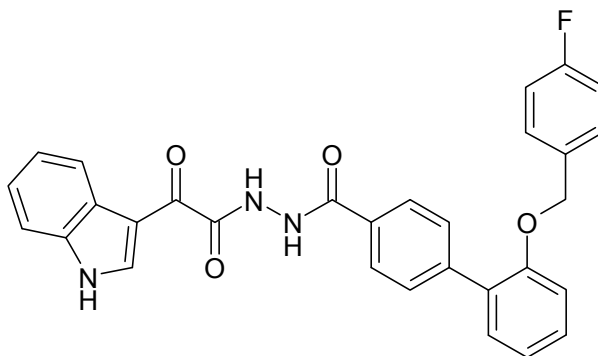
2-(1*H*-Indol-3-yl)-*N'*-{4-[(6-methylpyrazin-2-yl)oxy]benzoyl}-2-oxoacetohydrazid (**27k**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (104 mg, 0.501 mmol), 4-[(6-Methyl-2-pyrazinyl)oxy]benzhydrazid (**70c**; 49 mg, 0.20 mmol) und Triethylamin (30 µl, 0.22 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 7 mg (8%) gelbes Pulver.

Schmp.: 273-275 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3288 cm⁻¹ (NH), 1707 cm⁻¹ und 1637 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.28-7.32 (m, 2H, ArH), 7.34-7.36 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 7.99-8.02 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.25 (m, 1H, ArH), 8.35 (s, 1H, Pyrazin-H), 8.40 (s, 1H, Pyrazin-H), 8.71 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, ArH), 10.60 (s, 1H, NH), 10.75 (s, 1H, NH), 12.35 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.5 (CH₃); 112.6, 120.7 (2C), 121.1, 122.6, 123.6, 129.3 (2C), 132.3, 138.4, 138.9 (tert. C); 112.5, 125.6, 128.6, 136.4, 151.1, 156.1, 158.1, 163.6, 164.7, 182.2 (quart. C); C₂₂H₁₇N₅O₄ (415.40); MS (EI): m/z (%) = 415 [M]⁺ (6); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 415.12805; gef. 415.12737; HPLC: 97.3% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm, t_N = 3.60 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O; 35:65), λ_{max}: 252 nm, 303 nm und 329 nm.

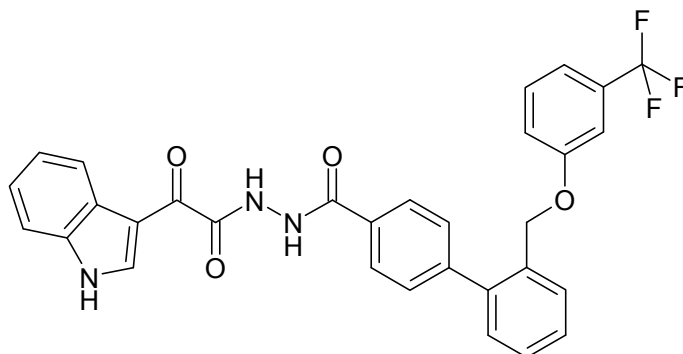
N'-(2'-[(4-Fluorbenzyl)oxy][1,1'-biphenyl]-4-yl)carbonyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoaceto-
hydrazid (**27I**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (106 mg, 0.511 mmol), 2'-[(4-Fluorbenzyl)oxy][1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74b**; 168 mg, 0.499 mmol) und Triethylamin (80 μ l, 0.58 mmol). Reaktionsdauer: 24 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Toluol/Ethanol 96% (3:1) umkristallisiert. Man erhält 61 mg (24%) gelbes, kristallines Pulver.

Schmp.: 227-231 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3247 cm^{-1} (NH), 1701 cm^{-1} und 1659 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.15 (s, 2H, OCH₂), 7.10 (ddd, 1H, J = 1.0/7.5/7.5 Hz, ArH), 7.19-7.23 (m, 2H, ArH), 7.25 (dd, 1H, J = 0.9/8.7 Hz, ArH), 7.28-7.33 (m, 2H, ArH), 7.38-7.41 (m, 2H, ArH), 7.44-7.47 (m, 2H, ArH), 7.56-7.59 (m, 1H, ArH), 7.69-7.70 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.95-7.96 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.72 (d, 1H, J = 2.3 Hz, ArH), 10.59 (s, 1H, NH), 10.74 (s, 1H, NH), 12.35 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.9 (OCH₂); 112.6, 113.2, 115.1 (d, 2C, $^2J_{\text{C,F}}$ = 21 Hz, $\underline{\text{C}}$ -CF), 121.1, 121.2, 122.6 (2C), 123.6, 127.1 (2C), 129.3 (2C), 129.4 (d, 2C, $^3J_{\text{C,F}}$ = 8.0 Hz, $\underline{\text{C}}$ -C-CF), 130.5, 138.4 (tert. C); 112.5, 125.6, 129.0, 130.5, 133.1 (d, $^4J_{\text{C,F}}$ = 3.0 Hz, $\underline{\text{C}}$ -C-C-CF), 136.4, 141.6, 154.9, 161.5 (d, $^1J_{\text{C,F}}$ = 244 Hz, $\underline{\text{C}}$ F), 163.6, 165.2, 182.3 (quart. C); C₃₀H₂₂FN₃O₄ (507.51); ber. C 71.00, H 4.37, N 8.28; gef. C 71.05, H 4.36, N 8.32; HPLC: 98.4% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm, t_{N} = 2.91 min, t_{M} = 1.08 min (ACN/H₂O; 60:40), λ_{max} : 267 nm und 303 nm.

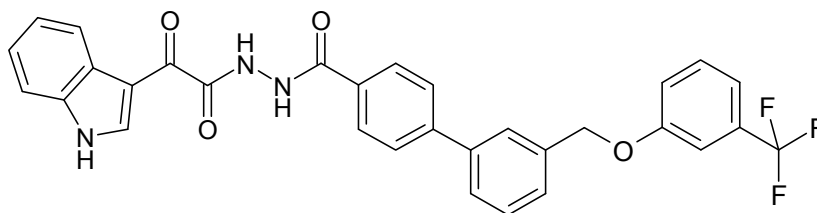
2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N*'-[(2'-{[3-(trifluormethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbonyl]acetohydrazid (**27m**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (192 mg, 0.925 mmol), 2'-{[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74c**; 355 mg, 0.919 mmol) und Triethylamin (140 μ l, 1.01 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% erhält man 190 mg (37%) hellgelbes Pulver.

Schmp.: 221-228 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3355 cm^{-1} und 3310 cm^{-1} (NH), 1707 cm^{-1} und 1639 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.08 (s, 2H, OCH₂), 7.21-7.23 (m, 2H, ArH), 7.28-7.32 (m, 3H, ArH), 7.41-7.42 (m, 1H, ArH), 7.48-7.53 (m, 3H, ArH), 7.57-7.58 (m, 1H, ArH) überlagert mit 7.59-7.60 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.66-7.68 (m, 1H, ArH), 7.98-8.00 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.26 (m, 1H, ArH), 8.71 (d, 1H, J = 3.1 Hz, ArH), 10.63 (s, 1H, NH), 10.75 (s, 1H, NH), 12.35 (d, 1H, J = 2.7 Hz, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.0 (OCH₂); 111.2 (q, $^3J_{\text{C},\text{F}}$ = 3.8 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 112.6, 117.3 (q, $^3J_{\text{C},\text{F}}$ = 3.9 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 118.8, 121.1, 122.7, 123.6, 127.4 (2C), 128.1, 128.7, 129.1 (2C), 129.9, 130.1, 130.7, 138.4 (tert. C); 112.5, 123.7 (q, $^1J_{\text{C},\text{F}}$ = 272 Hz, $\underline{\text{CF}}_3$), 125.6, 130.3 (q, $^2J_{\text{C},\text{F}}$ = 32 Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 131.0, 133.2, 136.4, 140.8, 143.4, 158.2, 163.6, 165.0, 182.2 (quart. C); C₃₁H₂₂F₃N₃O₄ (557.52); ber. C 66.78, H 3.98, N 7.54; gef. C 66.85, H 3.85, N 7.26; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, t_{N} = 4.96 min, t_{M} = 1.09 min (ACN/H₂O+0.05% HCOOH; 60:40), λ_{max} : 260 nm und 328 nm.

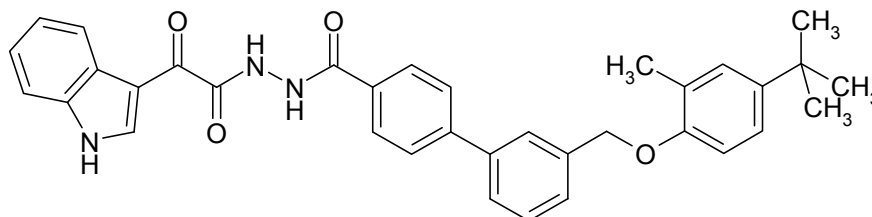
2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N'*-[(3'-{[3-(trifluormethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbonyl]acetohydrazid (**27n**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (209 mg, 1.01 mmol), 3'-{[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74d**; 387 mg, 1.00 mmol) und Triethylamin (160 μ l, 1.15 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96%/Toluen (2:1) erhält man 240 mg (43%) hellgelbes, kristallines Pulver.

Schmp.: 275-277 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3346 cm^{-1} , 3287 cm^{-1} und 3227 cm^{-1} (NH), 2961 cm^{-1} und 2905 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1699 cm^{-1} und 1676 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.30 (s, 2H, OCH₂), 7.30-7.33 (m, 3H, ArH), 7.37-7.40 (m, 2H, ArH), 7.53-7.59 (m, 4H, ArH), 7.77 (ddd, 1H, $J = 2.0/6.7/6.7$ Hz, ArH), 7.87-7.89 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.91 (m, 1H, ArH), 8.05-8.06 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.24-8.27 (m, 1H, ArH), 8.73 (s, 1H, ArH), 10.65 (s, 1H, NH), 10.76 (s, 1H, NH), 12.35 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 69.4 (OCH₂); 111.3 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 112.6, 117.2 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 119.0, 121.1, 122.7, 123.6, 126.4, 126.5, 126.7 (2C), 127.6, 128.1 (2C), 129.2, 130.7, 138.4 (tert. C); 112.5, 123.9 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 125.6, 130.2 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 131.1, 136.4, 137.3, 139.1, 143.0, 158.5, 163.6, 165.0, 182.3 (quart. C); C₃₁H₂₂F₃N₃O₄ (557.52); ber. C 66.78, H 3.98, N 7.54; gef. C 66.62, H 3.94, N 7.42; HPLC: 99.4% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, $t_N = 5.24$ min, $t_M = 1.09$ min (ACN/H₂O+0.05% HCOOH; 60:40), λ_{max} : 272 nm und 327 nm.

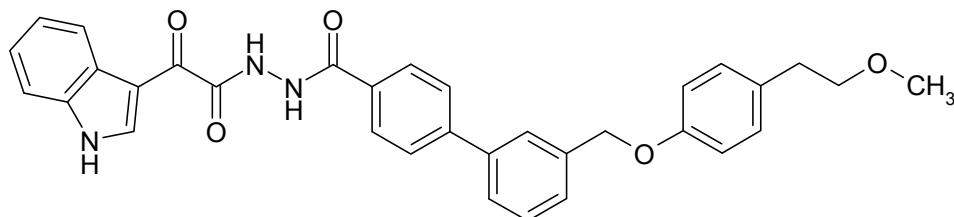
N'-(3'-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl][1,1'-biphenyl]-4-yl)carbonyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**27o**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (167 mg, 0.804 mmol), 3'-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl][1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74e**; 308 mg, 0.793 mmol) und Triethylamin (125 µl, 0.899 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Der erhaltene Rückstand wird zweimal aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 30 mg (7%) gelbes Pulver.

Schmp.: 256-261 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3308 cm⁻¹ (NH), 3150 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2956 cm⁻¹ und 2866 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1709 cm⁻¹ und 1638 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 1.25 (s, 9H, CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃), 5.19 (s, 2H, OCH₂), 6.95 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.14 (dd, 1H, *J* = 2.5/8.5 Hz, ArH), 7.19 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, ArH), 7.27-7.33 (m, 2H, ArH), 7.51-7.54 (m, 2H, ArH), 7.56-7.60 (m, 1H, ArH), 7.73 (ddd, 1H, *J* = 2.2/6.6/6.6 Hz, ArH), 7.85-7.87 (m, 3H, ArH, 2H sind Teil eines AA'XX'-Systems), 8.04-8.06 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.23-8.27 (m, 1H, ArH), 8.73 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, ArH), 10.63 (s, 1H, NH), 10.73 (s, 1H, NH), 12.34 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 16.4 (CH₃), 31.3 (3xCH₃), 69.0 (OCH₂); 111.3, 112.6, 121.2, 122.7, 123.2, 123.6, 125.7, 125.8, 126.7 (2C), 127.0, 127.5, 128.2 (2C), 129.2, 138.5 (tert. C); 33.6, 112.7, 125.2, 126.2, 131.2, 136.5, 138.6, 139.1, 142.6, 143.2, 154.1, 163.6, 165.1, 182.3 (quart. C); C₃₅H₃₃N₃O₄ (559.65); ber. C 75.11, H 5.94, N 7.51; gef. C 74.85, H 5.75, N 7.35; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, *t*_N = 3.00 min, *t*_M = 1.08 min (ACN/H₂O; 72:25), λ_{max}: 272 nm und 327 nm.

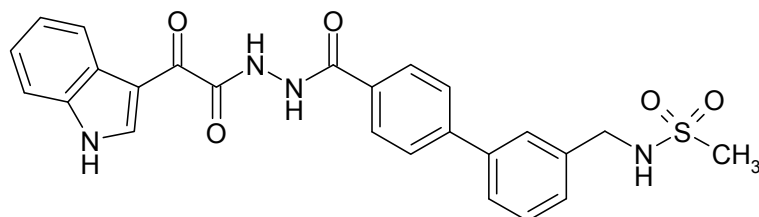
2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N'*-[(3'-{[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbonyl]acetohydrazid (**27p**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (280 mg, 1.35 mmol), 3'-{[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74f**; 505 mg, 1.34 mmol) und Triethylamin (205 μ l, 1.47 mmol). Reaktionsdauer: 5 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96%/Toluen (2:1) erhält man 115 mg (16%) gelbes, kristallines Pulver.

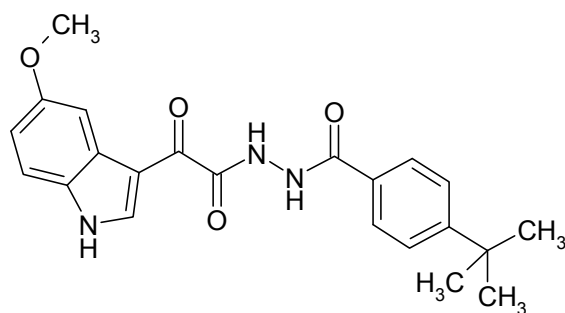
Schmp.: 251-255 °C; IR (KBr): 3305 cm^{-1} (NH), 2925 cm^{-1} und 2860 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1708 cm^{-1} und 1639 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.73 (t, 2H, J = 7.0 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$), 3.23 (s, 3H, OCH_3), 3.48 (t, 2H, J = 7.0 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 6.95-6.98 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.14-7.17 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.29-7.33 (m, 2H, ArH), 7.50 (ddd, 1H, J = 1.4/7.5/7.5 Hz, ArH), 7.53 (dd, 1H, J = 7.7/7.7 Hz, ArH), 7.57-7.60 (m, 1H, ArH), 7.74 (ddd, 1H, J = 1.5/7.3/7.3 Hz, ArH), 7.85 (m, 1H, ArH), 7.86-7.88 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.04-8.06 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.24-8.27 (m, 1H, ArH), 8.73 (d, 1H, J = 3.2 Hz, ArH), 10.65 (s, 1H, NH), 10.76 (s, 1H, NH), 12.36 (d, 1H, J = 2.9 Hz, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 34.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$), 57.7 (OCH_3), 68.9 (OCH_2), 72.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$); 112.6, 114.5 (2C), 121.1, 122.7, 123.6, 126.1, 126.3, 126.7 (2C), 127.4, 128.1 (2C), 129.1, 129.7 (2C), 138.4 (tert. C); 112.5, 125.6, 131.0, 131.1, 136.4, 138.1, 139.0, 143.1, 156.6, 163.6, 165.1, 182.3 (quart. C); $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$ (547.60); ber. C 72.38, H 5.34, N 7.67; gef. C 72.11, H 5.26, N 7.76; HPLC: 98.4% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, t_N = 4.06 min, t_M = 1.09 min (ACN/ H_2O +0.05% HCOOH ; 60:40), λ_{max} : 272 nm und 327 nm.

N-{[4'-(2-[2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetyl]hydrazino)carbonyl][1,1'-biphenyl]-3-yl]methyl}methansulfonamid (**27q**)



Nach AAV 6 aus 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (184 mg, 0.886 mmol), *N*-{[4'-(Hydrazinocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl]methyl}methansulfonamid (**74g**; 280 mg, 0.887 mmol) und Triethylamin (135 μ l, 0.971 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 60 mg (14%) hellgelbes Pulver.

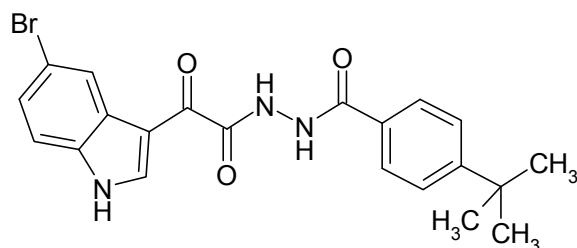
Schmp.: 274-280 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3305 cm^{-1} (NH), 1709 cm^{-1} und 1641 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.90 (s, 3H, CH₃), 4.27 (d, 2H, J = 6.1 Hz, CH₂), 7.29-7.32 (m, 2H, ArH), 7.41 (d, 1H, J = 7.5 Hz, ArH), 7.50 (dd, 1H, J = 7.5/7.5 Hz, ArH), 7.57-7.59 (m, 1H, ArH), 7.65 (t, 1H, J = 6.2 Hz, NH), 7.70 (d, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.76 (m, 1H, ArH), 7.85-7.87 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.05-8.06 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.24-8.26 (m, 1H, ArH), 8.73 (d, 1H, J = 3.2 Hz, ArH), 10.65 (s, 1H, NH), 10.76 (s, 1H, NH), 12.35 (d, 1H, J = 2.9 Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 39.8 (CH₃), 45.9 (CH₂); 112.6, 121.1, 122.7, 123.6, 125.7, 126.1, 126.6 (2C), 127.4, 128.1 (2C), 129.1, 138.4 (tert. C); 112.5, 125.6, 131.0, 136.4, 138.9, 139.0, 143.2, 163.6, 165.0, 182.3 (quart. C); C₂₅H₂₂N₄O₅S (490.53); ber. C 61.21, H 4.52, N 11.42; gef. C 60.96, H 4.56, N 11.47; HPLC: 96.8% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, t_N = 3.81 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O+0.05% HCOOH; 40:60), λ_{max} : 272 nm und 327 nm.

N'-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**28a**)

Nach AAV 6 aus 2-(5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30b**; 80.3 mg, 0.338 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (64.8 mg, 0.337 mmol) und Triethylamin (53 μ l, 0.38 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 87 mg (67%) hellgelbe Kristalle.

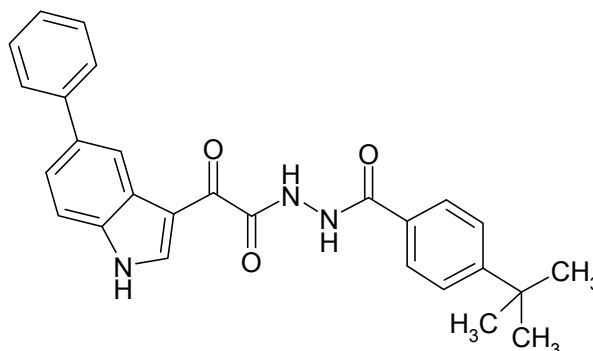
Schmp.: 303-305 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3382 cm^{-1} , 3329 cm^{-1} und 3228 cm^{-1} (NH), 2993 cm^{-1} , 2963 cm^{-1} und 2828 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1707 cm^{-1} und 1666 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.32 (s, 9H, CH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 6.93 (dd, 1H, J = 2.6/8.8 Hz, ArH), 7.47 (d, 1H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.54-7.56 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.74 (d, 1H, J = 2.6 Hz, ArH), 7.87-7.89 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.65 (d, 1H, J = 3.3 Hz, ArH), 10.51 (s, 1H, NH), 10.68 (s, 1H, NH), 12.25 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 ($3 \times \text{CH}_3$), 55.2 (OCH_3); 103.0, 113.1, 113.4, 125.3 (2C), 127.3 (2C), 138.4 (tert. C); 34.6, 112.4, 126.6, 129.4, 131.1, 154.8, 156.0, 163.7, 165.3, 182.2 (quart. C); $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ (393.44); ber. C 67.16, H 5.89, N 10.68; gef. C 67.11, H 6.07, N 10.92; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_N = 2.83 min, t_M = 1.04 min (ACN/ H_2O ; 50:50), λ_{max} : 248 nm, 283 nm und 331 nm.

2-(5-Brom-1*H*-indol-3-yl)-*N'*-(4-*tert*-butylbenzoyl)-2-oxoacetohydrazid (**28b**)



Nach AAV 6 aus 2-(5-Brom-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30c**; 143 mg, 0.499 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (100 mg, 0.520 mmol) und Triethylamin (80 μ l, 0.58 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 156 mg (71%) farblose Kristalle.

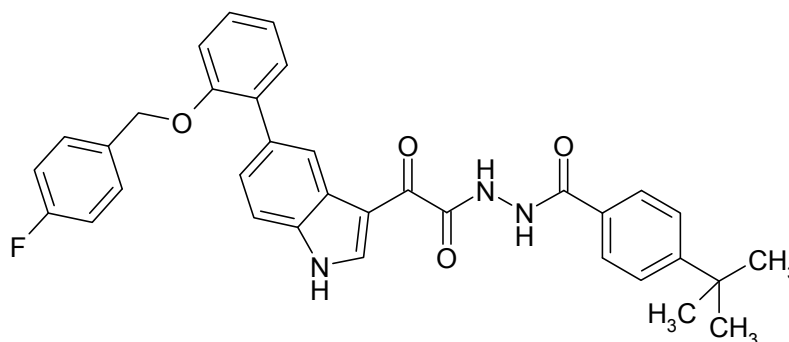
Schmp.: 308-315 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3358 cm^{-1} und 3224 cm^{-1} (NH), 2966 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1687 cm^{-1} und 1647 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.32 (s, 9H, CH_3), 7.46 (dd, 1H, J = 2.0/8.6 Hz, ArH), 7.54-7.56 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems) überlagert mit 7.56 (dd, 1H, J = 0.6/8.6 Hz, ArH), 7.86-7.88 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.37 (dd, 1H, J = 0.5/2.0 Hz, ArH), 8.75 (s, 1H, ArH), 10.51 (s, 1H, NH), 10.73 (s, 1H, NH), 12.49 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 (3x CH_3); 114.8, 123.2, 125.2 (2C), 126.2, 127.2 (2C), 139.4 (tert. C); 34.6, 111.9, 115.4, 127.4, 129.4, 135.2, 154.8, 163.1, 165.3, 182.2 (quart. C); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}_3$ (442.31); ber. C 57.02, H 4.56, N 9.50; gef. C 57.02, H 4.44, N 9.27; HPLC: 98.8% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, t_N = 2.19 min, t_M = 1.09 min (ACN/ H_2O +0.05% HCOOH ; 60:40), λ_{max} : 325 nm.

N'-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-2-oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)acetohydrazid (**28c**)

Nach AAV 6 aus 2-Oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)acetylchlorid (**78a**; 59 mg, 0.21 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (38 mg, 0.20 mmol) und Triethylamin (30 μ l, 0.22 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 45 mg (51%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 302-306 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3354 cm^{-1} , 3320 cm^{-1} und 3230 cm^{-1} (NH), 2953 cm^{-1} und 2869 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1699 cm^{-1} und 1649 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.32 (s, 9H, CH_3), 7.37 (tt, 1H, J = 1.2/7.4 Hz, ArH), 7.49-7.52 (m, 2H, ArH), 7.55-7.57 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.61 (dd, 1H, J = 1.8/8.4 Hz, ArH), 7.67 (dd, 1H, J = 0.8/8.5 Hz, ArH), 7.70 (dd, 2H, J = 1.2/8.3 Hz, ArH), 7.88-7.90 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.49 (dd, 1H, J = 0.7/1.9 Hz, ArH), 8.75 (s, 1H, ArH), 10.53 (s, 1H, NH), 10.73 (s, 1H, NH), 12.42 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 (3x CH_3); 113.1, 119.1, 122.9, 125.3 (2C), 126.8 (3C), 127.3 (2C), 128.9 (2C), 139.1 (tert. C); 34.6, 112.7, 126.3, 129.4, 135.2, 135.9, 141.1, 154.8, 163.6, 165.3, 182.4 (quart. C); $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ (439.51); ber. C 73.78, H 5.73, N 9.56; gef. C 73.58, H 5.53, N 9.24; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm, t_N = 3.12 min, t_M = 1.01 min (ACN/ H_2O ; 60:40), λ_{max} : 244 nm und 334 nm.

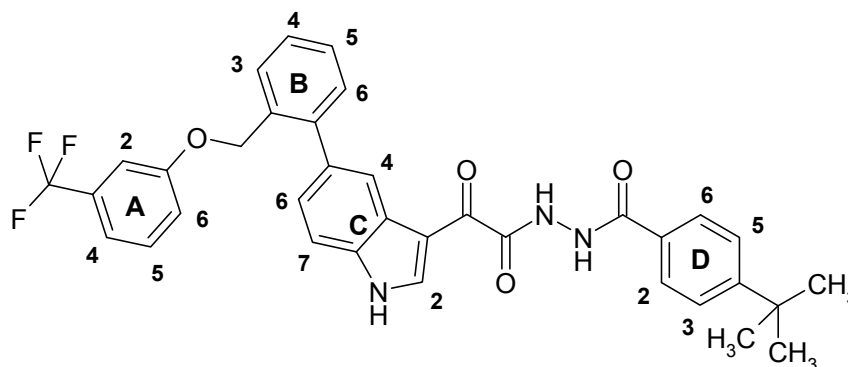
N'-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-2-(5-{2-[(4-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoaceto-
hydrazid (**28d**)



Nach AAV 6 aus 2-(5-{2-[(4-Fluorobenzyl)oxy]phenyl}-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**78b**; 181 mg, 0.444 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (86 mg, 0.45 mmol) und Triethylamin (70 μ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 120 mg (48%) gelbes Pulver.

Schmp.: 243-246 °C; IR (KBr): 3367 cm^{-1} und 3253 cm^{-1} (NH), 3056 cm^{-1} (CH aromatisch), 2962 cm^{-1} und 2868 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1697 cm^{-1} und 1627 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.33 (s, 9H, CH_3), 5.14 (s, 2H, OCH_2), 7.08 (ddd, 1H, $J = 1.0/7.4/7.4$ Hz, ArH), 7.15-7.19 (m, 2H, ArH), 7.23 (dd, 1H, $J = 0.7/8.2$ Hz, ArH), 7.35 (ddd, 1H, $J = 1.7/7.4/8.2$ Hz, ArH), 7.38 (dd, 1H, $J = 1.7/7.5$ Hz, ArH), 7.46 (dd, 1H, $J = 1.7/8.3$ Hz, ArH), 7.49-7.51 (m, 2H, ArH), 7.55-7.57 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.59 (dd, 1H, $J = 0.6/8.4$ Hz, ArH), 7.88-7.90 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.47 (dd, 1H, $J = 0.5/1.6$ Hz, ArH), 8.75 (s, 1H, ArH), 10.52 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH), 12.36 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 (3x CH_3), 68.7 (OCH_2); 112.0, 113.1, 115.0 (d, 2C, $^2J_{\text{C,F}} = 21$ Hz, $\underline{\text{C}}$ -CF), 121.1, 122.0, 125.2 (2C), 125.3, 127.3 (2C), 128.3, 129.4 (d, 2C, $^3J_{\text{C,F}} = 8.0$ Hz, $\underline{\text{C}}$ -C-CF), 130.8, 138.8 (tert. C); 34.6, 112.6, 125.5, 130.9, 132.6, 133.3 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 3.0$ Hz, $\underline{\text{C}}$ -C-C-CF), 135.4, 154.8, 154.9, 161.5 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 244$ Hz, $\underline{\text{C}}$ F), 163.5, 165.4, 182.2 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 512 Scans); $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_4$ (563.62); ber. C 72.45, H 5.37, N 7.46; gef. C 72.43, H 5.29, N 7.27; HPLC: 98.8% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 2.43$ min, $t_{\text{M}} = 1.11$ min (ACN/ H_2O +0.05% HCOOH ; 70:30), λ_{max} : 239 nm und 333 nm.

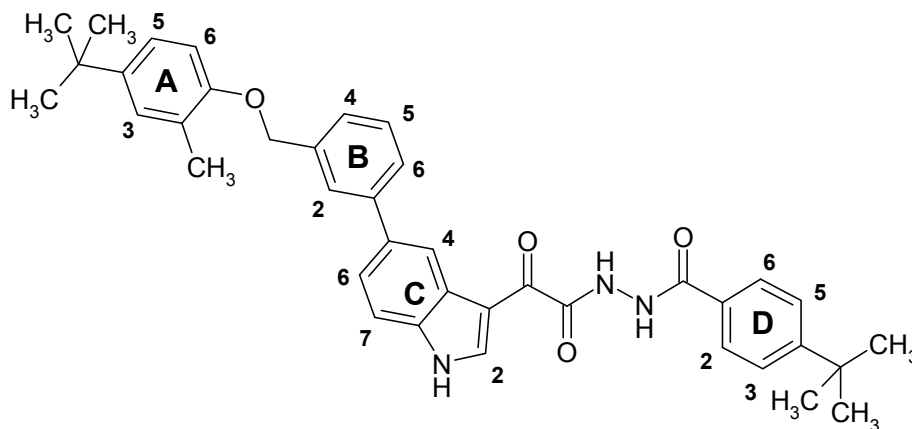
N'-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-2-oxo-2-[5-(2-{[3-(trifluormethyl)phenoxy]methyl}phenyl)-1*H*-indol-3-yl]acetohydrazid (**28e**)



Nach AAV 6 aus 2-Oxo-2-[5-(2-{[3-(trifluormethyl)phenoxy]methyl}phenyl)-1*H*-indol-3-yl]acetylchlorid (**78c**; 182 mg, 0.398 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (76 mg, 0.40 mmol) und Triethylamin (63 μ l, 0.45 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisieren aus Ethanol 70% erhält man 80 mg (33%) hellgelbes Pulver.

Schmp.: 197-203 °C; IR (KBr): 3379 cm^{-1} und 3228 cm^{-1} (NH), 2962 cm^{-1} und 2873 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1701 cm^{-1} und 1628 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.32 (s, 9H, CH_3), 5.06 (s, 2H, OCH_2), 7.16 (m, 1H, $\text{H}_\text{B-3}$), 7.20 (dd, 1H, $J = 2.2/8.2$ Hz, $\text{H}_\text{B-4}$), 7.25 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, $\text{H}_\text{B-5}$), 7.36 (dd, 1H, $J = 1.7/8.3$ Hz, $\text{H}_\text{C-6}$), 7.41 (dd, 1H, $J = 1.7/7.4$ Hz, $\text{H}_\text{A-6}$), 7.44-7.50 (m, 3H, $\text{H}_\text{B-6}/\text{H}_\text{A-4}/\text{H}_\text{A-5}$), 7.55-7.56 (m, 2H, $\text{H}_\text{D-3}/\text{H}_\text{D-5}$, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.58 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_\text{C-7}$), 7.65 (dd, 1H, $J = 1.5/7.4$ Hz, $\text{H}_\text{A-2}$), 7.86-7.89 (m, 2H, $\text{H}_\text{D-2}/\text{H}_\text{D-6}$, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.26 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, $\text{H}_\text{C-4}$), 8.75 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, $\text{H}_\text{C-2}$), 10.50 (s, 1H, NH), 10.67 (s, 1H, NH), 12.40 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, Indol-NH) (Die Zuordnung der Protonen erfolgte auf Basis von H,H-COSY-Experimenten.); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 30.8 ($3\times\text{CH}_3$), 68.2 (OCH_2); 111.2 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 112.2, 117.2 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 119.0, 121.5, 124.7, 125.2 (2C), 127.2 (2C), 127.3, 128.4, 129.8, 130.3, 130.5, 139.0 (tert. C); 34.6, 112.6, 123.8 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{CF}}_3$), 125.7, 129.4, 130.1 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 133.3, 134.5, 135.7, 142.6, 154.8, 158.3, 163.4, 165.3, 182.2 (quart. C); $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ (613.63); ber. C 68.51, H 4.93, N 6.85; gef. C 68.10, H 4.81, N 6.60; HPLC: 97.8% bei 254 nm und 96.4% bei 280 nm, $t_\text{N} = 4.08$ min, $t_\text{M} = 1.11$ min (ACN/ $\text{H}_2\text{O}+0.05\%$ HCOOH; 70:30), λ_max : 226 nm und 330 nm.

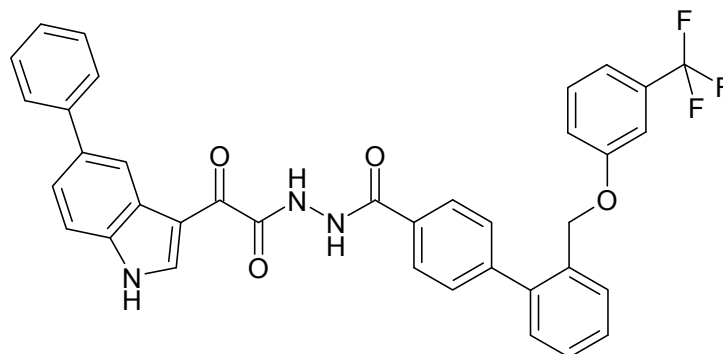
N'-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-2-(5-{3-[(4-*tert*-butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenyl}-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetohydrazid (**28f**)



Nach AAV 6 aus 2-(5-{3-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenyl}-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**78d**; 301 mg, 0.654 mmol), 4-*tert*-Butylbenzhydrazid (126 mg, 0.655 mmol) und Triethylamin (100 μ l, 0.719 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 286 mg (72%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 244-246 °C; IR (KBr): 3393 cm^{-1} und 3215 cm^{-1} (NH), 2951 cm^{-1} und 2866 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1700 cm^{-1} und 1629 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 1.24 (s, 9H, CH₃), 1.32 (s, 9H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 5.21 (s, 2H, OCH₂), 6.97 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H_A-6), 7.14 (dd, 1H, J = 2.5/8.5 Hz, H_A-5), 7.20 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H_A-3), 7.45-7.46 (m, 1H, H_B-4), 7.52 (dd, 1H, J = 7.7/7.7 Hz, H_B-5), 7.55-7.56 (m, 2H, H_D-3/ H_D-5, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.62 (dd, 1H, J = 1.8/8.4 Hz, H_C-6), 7.65-7.66 (m, 1H, H_B-6), 7.68 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H_C-7), 7.80 (m, 1H, H_B-2), 7.88-7.90 (m, 2H, H_D-2/ H_D-6, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.52 (d, 1H, J = 1.4 Hz, H_C-4), 8.76 (s, 1H, H_C-2), 10.52 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH), 12.42 (s, 1H, Indol-NH) (Die Zuordnung der Protonen erfolgte auf Basis von H,H-COSY-Experimenten.); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 16.4 (CH₃), 30.8 (3xCH₃), 31.3 (3xCH₃), 69.0 (OCH₂); 111.2, 113.2, 119.2, 122.9, 123.2, 125.3 (2C), 125.7 (2C), 126.1, 127.3 (2C), 127.5, 129.1, 139.1 (tert. C); 33.6, 34.6, 112.8, 125.1, 126.3, 129.5, 135.0, 136.0, 138.4, 141.2, 142.4, 154.1, 154.8, 163.6, 165.4, 182.4 (quart. C); C₃₉H₄₁N₃O₄ (615.76); ber. C 76.07, H 6.71, N 6.82; gef. C 75.91, H 6.55, N 6.60; HPLC: 99.6% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm, t_N = 3.47 min, t_M = 1.14 min (ACN/H₂O+0.05% HCOOH; 80:20), λ_{max} : 244 nm und 333 nm.

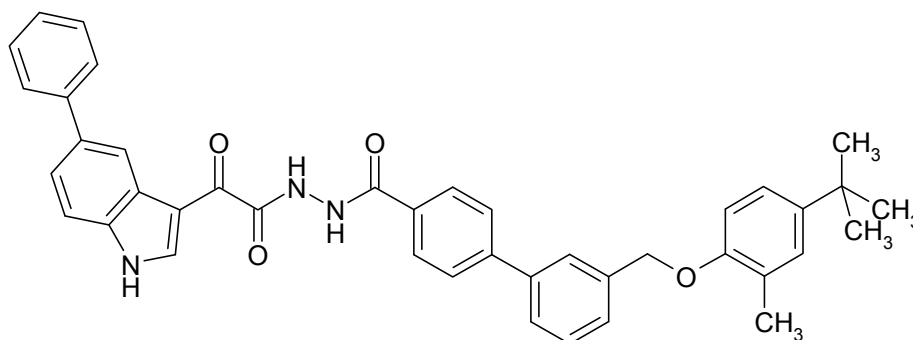
2-Oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)-*N*'-[(3'-{3-(trifluormethyl)phenoxy}methyl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]carbonyl]acetohydrazid (**29a**)



Nach AAV 6 aus 2-Oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)acetylchlorid (**78a**; 346 mg, 1.22 mmol), 2'-[[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl][1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74c**; 472 mg, 1.22 mmol) und Triethylamin (190 μ l, 1.37 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Der erhaltene Rückstand wird aus Ethanol 85% umkristallisiert. Man erhält 327 mg (52%) gelbes kristallines Pulver.

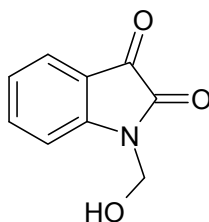
Schmp.: 175-186 °C; IR (KBr): 3337 cm^{-1} und 3250 cm^{-1} (NH), 3061 cm^{-1} (CH aromatisch), 1702 cm^{-1} , 1666 cm^{-1} und 1628 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.08 (s, 2H, CH_2), 7.21-7.22 (m, 2H, ArH), 7.29-7.30 (m, 1H, ArH), 7.37 (tt, 1H, $J = 1.1/7.0$ Hz, ArH), 7.41-7.43 (m, 1H, ArH), 7.48-7.53 (m, 5H, ArH), 7.59-7.61 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems) überlagert mit 7.62 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, ArH), 7.66-7.68 (m, 2H, ArH), 7.69-7.71 (m, 2H, ArH), 7.99-8.00 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.49 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, ArH), 8.74 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, ArH), 10.65 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH), 12.43 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.0 (OCH_2); 111.1 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 4.0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 113.1, 117.3 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 118.8, 119.1, 123.0, 126.8 (2C), 127.4 (2C), 128.1, 128.7, 128.9 (2C), 129.1 (2C), 129.9, 130.1, 130.7 (2C), 139.0 (tert. C); 112.7, 123.9 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 126.3, 130.2 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 131.0, 133.2, 135.3, 135.9, 140.7, 141.1, 143.5, 158.2, 163.5, 165.1, 182.3 (quart. C); $\text{C}_{37}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ (633.62); ber. C 70.14, H 4.14, N 6.63; gef. C 70.36, H 4.18, N 6.42; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, $t_N = 3.52$ min, $t_M = 1.11$ min (ACN/ H_2O +0.05% HCOOH ; 70:30), λ_{max} : 248 nm und 333 nm.

N'-(3'-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl][1,1'-biphenyl]-4-yl)carbonyl)-2-oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)acetohydrazid (**29b**)



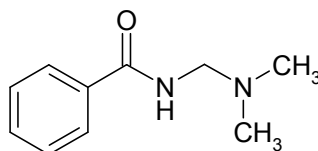
Nach AAV 6 aus 2-Oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)acetylchlorid (**78a**; 285 mg, 1.00 mmol), 3'-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl][1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74e**; 389 mg, 1.00 mmol) und Triethylamin (160 μ l, 1.15 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Aufkochen in Ethanol 96% erhält man 350 mg (55%) hellgelbes Pulver.

Schmp.: 287-289 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3316 cm^{-1} (NH), 1707 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.25 (s, 9H, CH_3), 2.23 (s, 3H, CH_3), 5.19 (s, 2H, OCH_2), 6.96 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.14 (dd, 1H, $J = 2.4/8.4$ Hz, ArH), 7.20 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 7.38 (tt, 1H, $J = 1.2/7.1$ Hz, ArH), 7.49-7.52 (m, 2H, ArH) überlagert mit 7.53 (m, 1H, ArH) überlagert mit 7.55 (dd, 1H, $J = 7.5/7.5$ Hz, ArH), 7.62 (dd, 1H, $J = 1.9/8.5$ Hz, ArH), 7.68 (dd, 1H, $J = 0.6/8.5$ Hz, ArH), 7.71 (dd, 2H, $J = 1.3/8.4$ Hz, ArH), 7.74 (ddd, 1H, $J = 1.6/7.1/7.1$ Hz, ArH), 7.86 (m, 1H, ArH) überlagert mit 7.87-7.88 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.06-8.07 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.50 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, ArH), 8.76 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, ArH), 10.67 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH), 12.43 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 16.4 (CH_3), 31.3 (3x CH_3), 68.9 (OCH_2); 111.2, 113.1, 119.1, 123.0, 123.1, 125.8, 126.2, 126.7 (2C), 126.8, 126.9 (2C), 127.0, 127.5, 128.1 (2C), 128.9 (2C), 129.2, 139.1 (tert. C); 33.6, 112.7, 125.1, 126.3, 131.1, 135.3, 136.0, 138.5, 139.0, 141.1, 142.4, 143.2, 154.0, 163.5, 165.1, 182.3 (quart. C); $\text{C}_{41}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4$ (635.75); ber. C 77.46, H 5.87, N 6.61; gef. C 77.27, H 5.77, N 6.39; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, $t_N = 2.99$ min, $t_M = 1.14$ min (ACN/ H_2O +0.05% HCOOH ; 80:20), λ_{max} : 251 nm und 332 nm.

1-(Hydroxymethyl)-1*H*-indol-2,3-dion (**42**)

Eine Suspension von 1*H*-Indol-2,3-dion (148 mg, 1.01 mmol) und 37%iger Formaldehydlösung (3.0 ml, 40 mmol) wird in Wasser (10 ml) für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Die dann vorliegende Lösung wird heiß filtriert und 24 h im Kühlschrank stehen gelassen, wobei das Produkt in kristalliner Form ausfällt und abgesaugt werden kann. Man erhält 96 mg (54%) orangerote Kristalle, die ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt werden.

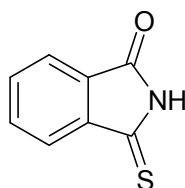
Schmp.: 151-155 °C (Lit.¹⁶²: 150-152 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 5.09 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 6.41 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, OH), 7.17 (ddd, 1H, *J* = 1.0/7.6/7.6 Hz, ArH), 7.26 (ddd, 1H, *J* = 0.8/0.8/7.9 Hz, ArH), 7.59 (ddd, 1H, *J* = 0.8/1.5/7.6 Hz, ArH), 7.70 (ddd, 1H, *J* = 1.3/7.9/7.9 Hz, ArH).

N-[(Dimethylamino)methyl]benzamid (**45**)

Benzamid (243 mg, 2.00 mmol) wird mit 37%iger Formaldehydlösung (0.170 ml, 2.27 mmol), 33%iger Dimethylaminlösung (0.410 ml, 2.28 mmol) und Wasser (0.4 ml) bis zur vollständigen Lösung des Benzamids erwärmt. Anschließend wird für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Wassers im Vakuum erhält man 240 mg (67%) gelbes Öl (Lit.⁸⁷: 72%). Das Produkt wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.21 (s, 6H, CH₃), 4.08 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂), 7.54-7.49 (m, 2H, ArH), 7.51-7.56 (m, 1H, ArH), 7.87-7.90 (m, 2H, ArH), 8.71 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH).

3-Thioxoisindolin-1-on (47)



Methode A

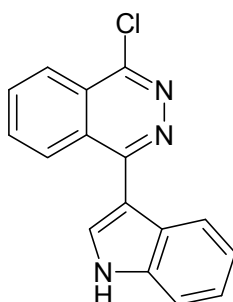
1*H*-Isoindol-1,3(2*H*)dion (150 mg, 1.02 mmol) wird mit Lawessons Reagenz (208 mg, 0.514 mmol) in Toluol (10 ml) 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum in Anwesenheit von Kieselgel erfolgt die Isolierung des Produkts mittels Säulenchromatographie (Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat, 2:1). Man erhält 56 mg (35%) rotes, kristallines Pulver, welches ohne Reinigung weiterverwendet wird.

Schmp.: 170-174 °C (Lit.⁹²: 176 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.79-7.80 (m, 1H, ArH), 7.82-7.88 (m, 2H, ArH), 7.90-7.91 (m, 1H, ArH), 12.81 (s, 1H, NH).

Methode B

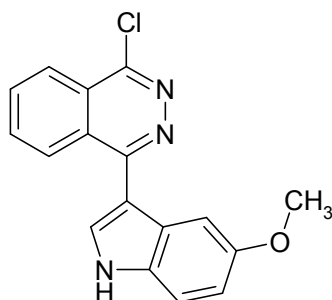
1*H*-Isoindol-1,3(2*H*)dion (74.2 mg, 0.504 mmol) wird mit Lawessons Reagenz (102 mg, 0.252 mmol) in getrocknetem THF (5 ml) 3 h bei 60 °C gerührt. Der Ansatz wird anschließend mittels Säulenchromatographie getrennt. Als Vorbereitung hierfür wird dem Ansatz Kieselgel (ca. 1 g) hinzugefügt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Elution erfolgt mit einem Gemisch aus Petrolether und Ethylacetat (2:1). Die gewünschten Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Man erhält 6 mg (8%) rotes, kristallines Pulver.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der nach Methode A erhaltenen Verbindung überein.

1-Chlor-4-(1*H*-indol-3-yl)phthalazin (**64a**)

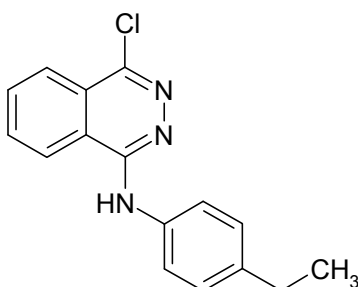
Eine Mischung aus 1,4-Dichlorphthalazin (199 mg, 1.00 mmol), 1*H*-Indol (118 mg, 1.01 mmol) und Aluminiumchlorid (135 mg, 1.01 mmol) wird in Dichlorethan (10 ml) unter Stickstoffatmosphäre 1 h bei 80 °C gerührt. Der Ansatz wird anschließend unter Rühren in Eiswasser (35 ml) gegossen und weitere 15 min gerührt, wobei es zur Bildung eines Niederschlags kommt. Dieser wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Man erhält 197 mg (70%) gelboranges Pulver, welches ohne weitere Reinigung zu Verbindung **25a** umgesetzt wird. **64a**, welches für die Testung der biologischen Aktivität bereitgestellt wird, wird aus Ethanol 96% umkristallisiert. Man erhält 111 mg (40%) hellorange Kristalle.

Schmp.: 230-231 °C (Lit.⁹⁷: 210-212 °C); IR (KBr): 3443 cm⁻¹ (NH), 3043 cm⁻¹ (CH aromatisch); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.14-7.18 (m, 1H, ArH), 7.24-7.28 (m, 1H, ArH), 7.57-7.59 (m, 1H, ArH), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, ArH), 8.10-8.19 (m, 2H, ArH), 8.33-8.35 (m, 1H, ArH), 8.44-8.47 (m, 1H, ArH), 11.93 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 112.0, 120.4, 120.6, 122.3, 124.7, 127.0, 129.0, 133.7, 134.0 (tert. C); 109.9, 125.3, 126.2, 126.7, 136.5, 151.7, 155.7 (quart. C); C₁₆H₁₀ClN₃ (279.72); ber. C 68.70, H 3.60, N 15.02; gef. C 69.03, H 3.56, N 14.76; HPLC: 99.3% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, *t*_N = 2.99 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O; 50:50), λ_{max}: 224 nm, 275 nm und 353 nm.

1-Chlor-4-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)phthalazin (64b)

Eine Mischung aus 1,4-Dichlorphthalazin (200 mg, 1.00 mmol), 5-Methoxy-1*H*-indol (151 mg, 1.03 mmol) und Aluminiumchlorid (136 mg, 1.02 mmol) wird in Dichlorethan (10 ml) unter Stickstoffatmosphäre 2.5 h bei 80 °C gerührt. Der Ansatz wird anschließend unter Rühren in Eiswasser (35 ml) gegossen und weitere 15 min gerührt, wobei es zur Bildung eines Niederschlags kommt. Dieser wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Man erhält 164 mg (53%) gelboranges Pulver, das ohne Reinigung weiter zu **25b** umgesetzt wird.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 3.73 (s, 3H, OCH₃), 6.89 (dd, 1H, *J* = 2.5/8.8 Hz, ArH), 7.43 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 7.45 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 8.04 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz, ArH), 8.12-8.20 (m, 2H, ArH), 8.34-8.36 (m, 1H, ArH), 8.46-8.48 (m, 1H, ArH), 11.79 (s, 1H, NH).

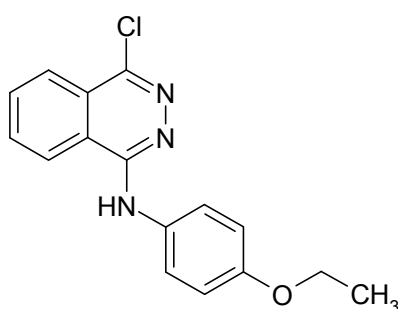
4-Chlor-*N*-(4-ethylphenyl)phthalazin-1-amin (69a)

Zu einer Lösung von 1,4-Dichlorphthalazin (34 mg, 0.17 mmol) in Ethanol (25 ml) wird 4-Ethylanilin (20 μ l, 0.16 mmol) gegeben und 7 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Einengen des Lösungsmittels im Vakuum wird der zurückbleibende Feststoff aus Toluol

umkristallisiert. Man erhält 20 mg (45%) gelbes Pulver, das weiter zu **26a** umgesetzt wird.

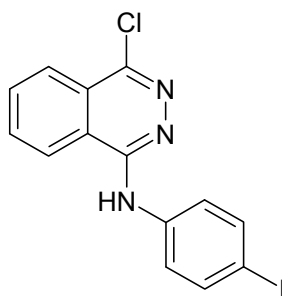
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400.1 MHz): δ (ppm) = 1.21 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, CH_3), 2.61 (q, 2H, $J = 7.7$ Hz, CH_2), 7.21-7.23 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.74-7.76 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.06-8.13 (m, 2H, ArH), 8.16-8.18 (m, 1H, ArH), 8.65-8.67 (m, 1H, ArH), 9.30 (s, 1H, NH).

4-Chlor-*N*-(4-ethoxyphenyl)phthalazin-1-amin (**69b**)



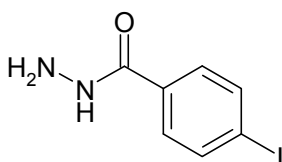
Zu einer Lösung von 1,4-Dichlorphthalazin (154 mg, 0.774 mmol) in Ethanol (50 ml) wird 4-Ethoxyanilin (100 μl , 0.773 mmol) gegeben und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt. Man erhält 210 mg (90%) gelbes Pulver, welches ohne Reinigung weiter zu **26b** umgesetzt wird.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3), 4.09 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, OCH_2), 7.07-7.09 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.53-7.55 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.21-8.26 (m, 2H, ArH), 8.28-8.29 (m, 1H, ArH), 9.00 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, ArH), 11.20 (s, 1H, NH, Signal wird durch D_2O -Zugabe gelöscht).

4-Chlor-N-(4-iodophenyl)phthalazin-1-amin (**69c**)

Zu einer Lösung von 1,4-Dichlorphthalazin (60.5 mg, 0.304 mmol) in Ethanol (20 ml) wird 4-Iodanilin (65.4 mg, 0.299 mmol) gegeben und 7 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand aus Toluol umkristallisiert. Man erhält 46 mg (40%) gelbes Pulver, das weiter zu **26c** umgesetzt wird.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.68-7.69 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.75-7.79 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.15-8.19 (m, 2H, ArH), 8.20-8.25 (m, 1H, ArH), 8.79-8.80 (m, 1H, ArH), 10.12 (br s, 1H, NH).

4-Iodbenzhydrazid (**35h**)

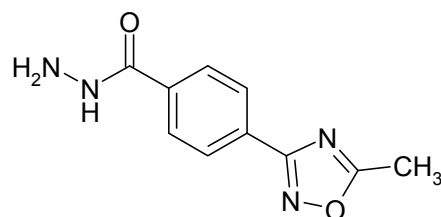
Methode A

Hydrazin-Monohydrat (194 μl , 4.00 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von 4-Iodbenzoesäureethylester (167 μl , 1.00 mmol) in getrocknetem Ethanol (3 ml) gegeben und bis zur vollständigen Umsetzung 7 h zum Rückfluss erhitzt (dünnschichtchromatographische Kontrolle). Das während des Refluxierens ausfallende Produkt wird nach dem Abkühlen abgesaugt und mit Ethanol (15 ml) gewaschen. Man erhält 191 mg (73%) farblose Kristalle, die ohne weitere Reinigung umgesetzt werden.

Methode B

Zu einer Lösung von 4-Iodbenzoesäureethylester (1.67 ml, 10.0 mmol) in Ethanol (3 ml) wird tropfenweise Hydrazin-Monohydrat (1.22 ml, 25.0 mmol) gegeben und 9 h bis zur vollständigen Umsetzung zum Rückfluss erhitzt (dünnschichtchromatographische Kontrolle). Der während des Refluxierens ausfallende Feststoff wird nach dem Abkühlen abgesaugt. Die abgesaugte Flüssigkeit wird mit Wasser (ca. 30 ml) versetzt, wodurch weiteres Produkt gefällt wird. Die gefällten Produkte werden vereinigt und mit Ethanol (ca. 30 ml) gewaschen. Man erhält 2.45 g (93%) farblose Kristalle, die ohne Umkristallisation weiter verwendet werden.

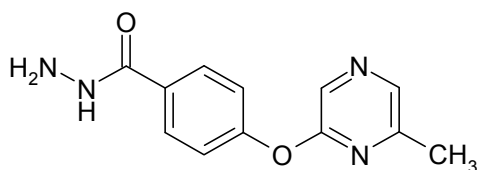
Schmp.: 169-170 °C (Lit.¹⁶³: 168-169 °C)

4-(5-Methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzhydrazid (70b)

Hydrazin-Monohydrat (485 µl, 9.98 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von 4-(5-Methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzoesäureethylester (232 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem Ethanol (4 ml) gegeben und bis zur vollständigen Umsetzung 30 h zum Rückfluss erhitzt (dünnschichtchromatographische Kontrolle). Der während des Refluxierens ausgefallene Feststoff wird nach dem Abkühlen abgesaugt. Man erhält 184 mg (84%) weißes Pulver, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wird.

Schmp.: 237-241 °C; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.68 (s, 3H, CH₃), 4.57 (s, 2H, NH₂), 7.97-8.00 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.05-8.08 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.94 (s, 1H, NH).

4-[(6-Methylpyrazin-2-yl)oxy]benzhydrazid (**70c**)



Methode A

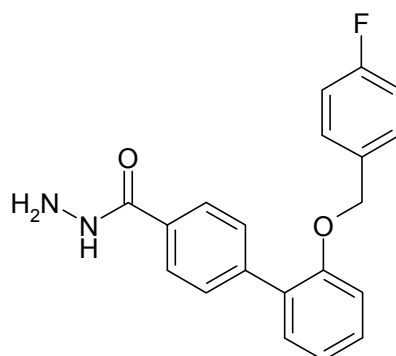
Hydrazin-Monohydrat (388 μ l, 7.98 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von 4-[(6-Methylpyrazin-2-yl)oxy]benzoesäureethylester (259 mg, 1.00 mmol) in getrocknetem Ethanol (3 ml) gegeben und 55 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird abgebrochen und der beim Abkühlen ausgefallene Feststoff abgesaugt. Man erhält 20 mg (8%) weißes, kristallines Pulver, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wird.

Schmp.: 166-167 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 2.35 (s, 3H, CH₃), 4.51 (br s, 2H, NH₂), 7.23-7.27 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.86-7.90 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.32 (d, 1H, J = 0.5 Hz, Pyrazin-H), 8.34 (d, 1H, J = 0.5 Hz, Pyrazin-H), 9.77 (s, 1H, NH).

Methode B

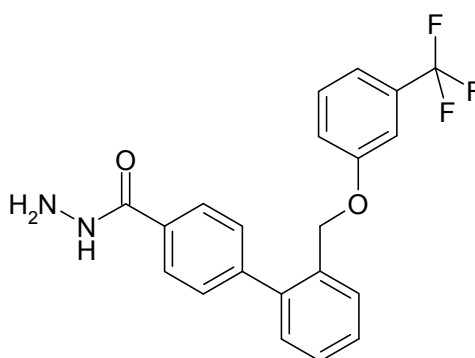
Zu einer Lösung von 4-[(6-Methylpyrazin-2-yl)oxy]benzoesäureethylester (258 mg, 1.00 mmol) in Ethanol (5 ml) wird tropfenweise Hydrazin-Monohydrat (121 μ l, 2.49 mmol) gegeben und 32 h zum Rückfluss erhitzt. Das beim Abkühlen ausgefallene Produkt wird abgesaugt und mit Ethanol (15 ml) gewaschen. Man erhält 39 mg (16%) weißes Pulver, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wird.

Die analytischen Daten entsprechen denen der nach Methode A erhaltenen Verbindung.

2'-[(4-Fluorbenzyl)oxy][1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74b**)

Nach AAV 7 aus 4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 263 mg, 1.00 mmol), 2-[(4-Fluorbenzyl)oxy]phenylboronsäure (253 mg, 1.03 mmol), DBU (149 μ l, 0.998 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (63 mg, 0.055 mmol). Man erhält 193 mg (57%) gelbes, öliges Produkt, das ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

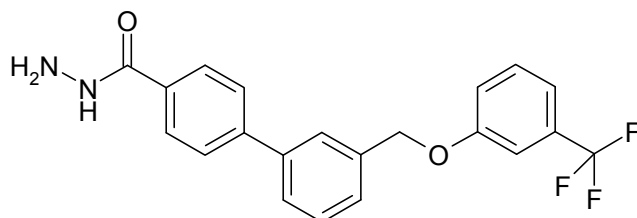
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 4.54 (br s, 2H, NH_2), 5.13 (s, 2H, OCH_2), 7.07 (ddd, 1H, $J = 1.0/7.4/7.4$ Hz, ArH), 7.16-7.20 (m, 2H, ArH, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.21-7.23 (m, 1H, ArH), 7.34-7.37 (m, 2H, ArH, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.40-7.44 (m, 2H, ArH), 7.58-7.61 (m, 2H, ArH, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.82-7.85 (m, 2H, ArH, Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 9.78 (s, 1H, NH).

2'-[[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl][1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74c**)

Nach AAV 7 aus 4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 265 mg, 1.01 mmol), 2-[[3-Trifluormethyl)phenoxy]methyl]phenylboronsäure (298 mg, 1.01 mmol), DBU (149 μ l, 0.998 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (58 mg, 0.050 mmol). Das gelbe, klebrig-ölige Produkt (250 mg, 65%) wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

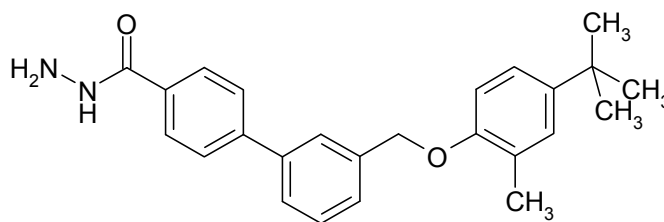
IR (KBr): 3310 cm^{-1} (NH), 3065 cm^{-1} (CH aromatisch), 2929 cm^{-1} (CH aliphatisch); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.54 (br s, 2H, NH_2), 5.05 (s, 2H, OCH_2), 7.19-7.20 (m, 2H, ArH), 7.27-7.29 (m, 1H, ArH), 7.37-7.38 (m, 1H, ArH), 7.47-7.49 (m, 3H, ArH) überlagert mit 7.50-7.51 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.64-7.65 (m, 1H, ArH), 7.86-7.88 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.83 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.0 (OCH_2); 111.1 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.5$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 117.3 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 118.9, 126.8 (2C), 128.0, 128.6, 128.8 (2C), 129.9, 130.0, 130.6 (tert. C); 123.9 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 130.2 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 132.1, 133.2, 140.9, 142.5, 158.2, 165.3 (quart. C).

3'-[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74d**)



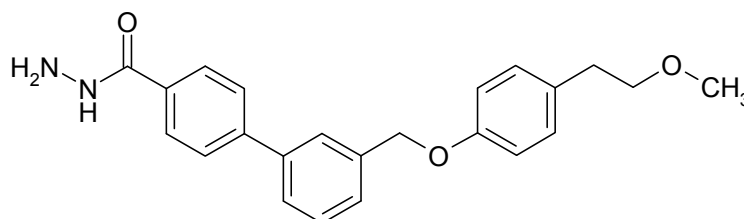
Nach AAV 7 aus 4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 262 mg, 1.00 mmol), 3'-[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl}phenylboronsäure (299 mmg, 1.01 mmol), DBU (149 μl , 0.998 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (59 mg, 0.051 mmol). Das gelbe, wachsartige Produkt (218 mg, 56%) wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

IR (KBr): 3288 cm^{-1} (NH), 3057 cm^{-1} (CH aromatisch), 2922 cm^{-1} und 2863 cm^{-1} (CH aliphatisch); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.56 (s, 2H, NH_2), 5.28 (s, 2H, OCH_2), 7.31 (ddd, 1H, $J = 0.7/7.6/7.6$ Hz, ArH), 7.36-7.39 (m, 2H, ArH), 7.51-7.56 (m, 3H, ArH), 7.72 (ddd, 1H, $J = 2.0/6.9/6.9$ Hz, ArH), 7.77-7.79 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.85 (m, 1H, ArH), 7.93-7.95 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.86 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 69.4 (OCH_2); 111.3 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.7$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 117.2 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 119.0, 126.3, 126.4, 126.5 (2C), 127.4, 127.6 (2C), 129.2, 130.7 (tert. C); 123.9 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 130.2 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 132.2, 137.2, 139.3, 142.2, 158.5, 165.4 (quart. C).

3'-{[4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74e**)

Durchführung nach AAV 7 aus 4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 264 mg, 1.01 mmol), 3-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenylboronsäure (301 mg, 1.01 mmol), DBU (149 μ l, 0.998 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (61 mg, 0.053 mmol). Man erhält 318 mg (81%) gelbes Öl, das ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

IR (KBr): 3280 cm^{-1} (NH), 3053 cm^{-1} (CH aromatisch), 2953 cm^{-1} und 2863 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1643 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.24 (s, 9H, CH_3), 2.21 (s, 3H, CH_3), 4.55 (br s, 2H, NH_2), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 6.94 (d, 1H, J = 8.6 Hz, ArH), 7.13 (dd, 1H, J = 2.2/8.2 Hz, ArH), 7.19 (dd, 1H, J = 0.6/2.5 Hz, ArH), 7.49 (ddd, 1H, J = 1.6/7.7/7.7 Hz, ArH) überlagert mit 7.51 (dd, 1H, J = 7.6/7.6 Hz, ArH), 7.68 (ddd, 1H, J = 1.7/7.1/7.1 Hz, ArH), 7.75-7.77 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.80 (m, 1H, ArH), 7.92-7.95 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.85 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 16.4 (CH_3), 31.3 (3x CH_3), 68.9 (OCH_2); 111.2, 123.1, 125.7, 126.1, 126.5 (2C), 126.8, 127.5, 127.6 (2C), 129.1 (tert. C); 33.6, 125.1, 132.1, 138.4, 139.2, 142.4, 154.0, 165.4, 170.3 (quart. C).

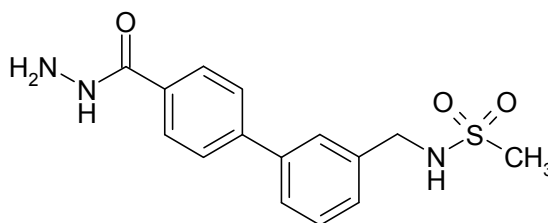
3'-{[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]methyl}[1,1'-biphenyl]-4-carbohydrazid (**74f**)

Nach AAV 7 aus 4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 264 mg, 1.01 mmol), 3-[[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]methyl]phenylboronsäure (292 mg, 1.02 mmol), DBU (149 μ l, 0.998 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (60 mg, 0.052 mmol). Man

erhält 304 mg (81%) gelbes, wachsartiges Produkt, das ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

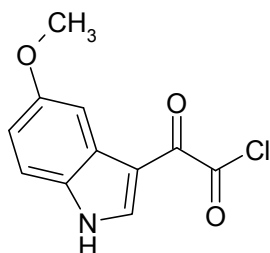
IR (KBr): 3308 cm^{-1} (NH), 3031 cm^{-1} (CH aromatisch), 2979 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 2863 cm^{-1} und 2824 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1625 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.73 (t, 2H, $J = 6.9\text{ Hz}$, CH_2), 3.22 (s, 3H, OCH_3), 3.47 (t, 2H, $J = 7.0\text{ Hz}$, CH_2), 4.58 (br s, 2H, NH_2), 5.15 (s, 2H, OCH_2), 6.94-6.96 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.13-7.16 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.48 (m, 1H, ArH), 7.50 (dd, 1H, $J = 7.6/7.6\text{ Hz}$, ArH), 7.69 (ddd, 1H, $J = 1.5/7.5/7.5\text{ Hz}$, ArH), 7.75-7.78 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.79 (m, 1H, ArH), 7.92-7.94 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.86 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 34.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$), 57.7 (OCH_3), 68.9 (OCH_2), 72.9 (OCH_2); 114.5 (2C), 126.0, 126.2, 126.5 (2C), 127.2, 127.5 (2C), 129.1, 129.7 (2C) (tert. C); 131.1, 132.1, 138.0, 139.2, 142.2, 156.6, 165.4 (quart. C).

N-{[4'-(Hydrazinocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl]methyl}methansulfonamid (**74g**)



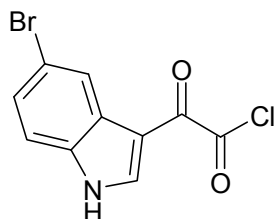
Nach AAV 7 aus 4-Iodbenzhydrazid (**35h**; 262 mg, 1.00 mmol), 3-[[[(Methylsulfonyl)amino]methyl]phenyl]boronsäure (229 mg, 1.00 mmol), DBU (149 μl , 0.998 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (58 mg, 0.050 mmol). Man erhält 320 mg (50%) hellgelbes Pulver, das ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.89 (s, 3H, CH_3), 4.25 (d, 2H, $J = 6.3\text{ Hz}$, CH_2), 4.54 (br s, 2H, NH_2), 7.38-7.39 (m, 1H, ArH), 7.47 (dd, 1H, $J = 7.7/7.7\text{ Hz}$, ArH), 7.62-7.65 (m, 2H, ArH überlagert mit Sulfonamid-NH), 7.71 (m, 1H, ArH), 7.75-7.77 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.9-7.95 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 9.85 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 39.8 (CH_3), 45.9 (CH_2); 125.6, 126.1, 126.4 (2C), 127.2, 127.5 (2C), 129.0 (tert. C); 132.1, 139.0, 139.1, 142.3, 165.4 (quart. C).

2-(5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30b**)

Nach AAV 9 aus Oxalylchlorid (120 μ l, 1.40 mmol) und 5-Methoxy-1*H*-indol (149 mg, 1.01 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Man erhält 95 mg (40%) oranges Pulver. Das Produkt wird ohne Umkristallisation weiter umgesetzt.

Schmp.: 128-129 °C (Lit.¹⁶⁴: 130 °C); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.92 (dd, 1H, *J* = 2.4/8.8 Hz, ArH), 7.45 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 7.68 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, ArH), 8.36 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, ArH), 12.35 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 55.2 (OCH₃); 102.8, 113.2, 113.4, 137.8 (tert. C); 112.0, 126.4, 131.3, 155.9, 165.2, 180.5 (quart. C).

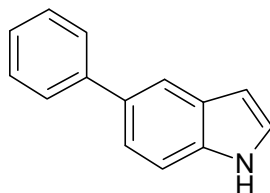
2-(5-Brom-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**30c**)

Nach AAV 9 aus Oxalylchlorid (120 μ l, 1.40 mmol) und 5-Brom-1*H*-indol (198 mg, 1.01 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Man erhält 190 mg (66%) gelbes Pulver, das ohne Umkristallisation weiter verwendet wird.

Schmp.: 200-201 °C; IR (KBr): 3199 cm⁻¹ (NH), 3050 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2929 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1780 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 7.43 (dd, 1H, *J* = 2.1/8.6 Hz, ArH), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 8.31 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.49 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, ArH), 12.63 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 114.7, 123.1, 126.2, 138.9 (tert. C); 111.7, 115.3, 127.3, 135.4,

164.7, 180.5 (quart. C); $C_{10}H_5BrClNO_2$ (286.51); ber. C 41.92, H 1.76, N 4.89; gef. C 41.96, H 1.57, N 4.63.

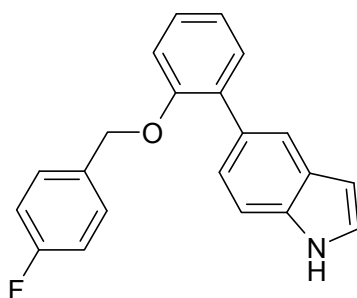
5-Phenyl-1*H*-indol (**77a**)



Nach AAV 8 aus 5-Brom-1*H*-indol (197 mg, 1.00 mmol), Phenylboronsäure (125 mg, 1.03 mmol), Natriumcarbonat (322 mg, 3.04 mmol), TBAB (324 mg, 1.01 mmol) und Palladium(II)acetat (1 mg, 0.004 mmol). Man erhält 88 mg (46%) grünes Pulver.

Schmp.: 75 °C (Lit.¹⁶⁵: 74 °C); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 6.48-6.49 (m, 1H, ArH), 7.29 (tt, 1H, J = 1.1/6.9 Hz, ArH), 7.37-7.48 (m, 5H, ArH), 7.64-7.67 (m, 2H, ArH), 7.81 (m, 1H, ArH), 11.13 (s, 1H, NH).

5-{2-[(4-Fluorbenzyl)oxy]phenyl}-1*H*-indol (**77b**)

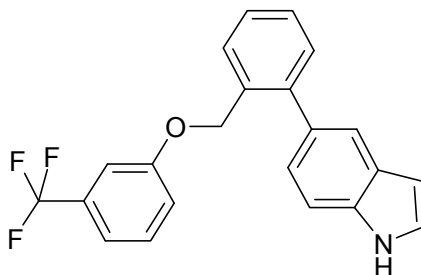


Nach AAV 8 aus 5-Brom-1*H*-indol (200 mg, 1.02 mmol), 2-[(4-Fluorbenzyl)oxy]phenylboronsäure (244 mg, 0.992 mmol), Natriumcarbonat (315 mg, 2.97 mmol), TBAB (324 mg, 1.01 mmol) und Palladium(II)acetat (1 mg, 0.004 mmol). Man erhält 256 mg (81%) gelbgrünes Pulver, das ohne Umkristallisation weiter umgesetzt wird.

Schmp.: 112 °C; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.1 MHz): δ (ppm) = 5.09 (s, 2H, OCH₂), 6.42-6.44 (m, 1H, ArH), 7.04 (ddd, 1H, J = 1.2/7.5/7.5 Hz, ArH), 7.13-7.17 (m, 3H, ArH),

7.26-7.30 (m, 2H, ArH), 7.32-7.35 (m, 2H, ArH), 7.38-7.43 (m, 3H, ArH), 7.67 (m, 1H, ArH), 11.08 (s, 1H, NH).

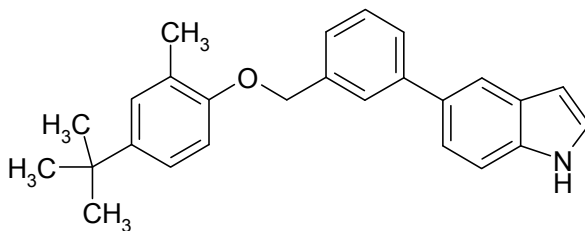
5-(2-{{3-(Trifluormethyl)phenoxy}methyl}phenyl)-1*H*-indol (**77c**)



Nach AAV 8 aus 5-Brom-1*H*-indol (197 mg, 1.00 mmol), 2-{{3-(Trifluormethyl)phenoxy}methyl}phenylboronsäure (302 mg, 1.02 mmol), Natriumcarbonat (316 mg, 2.98 mmol), TBAB (321 mg, 0.996 mmol) und Palladium(II)acetat (1 mg, 0.004 mmol). Man erhält 240 mg (65%) gelbes Öl. Das Produkt wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

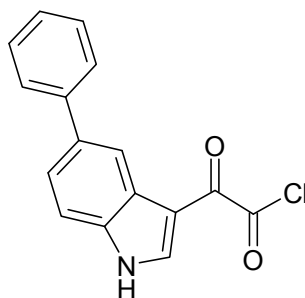
IR (NaCl): 3421 cm^{-1} (NH), 3064 cm^{-1} und 3026 cm^{-1} (CH aromatisch), 2936 cm^{-1} und 2880 cm^{-1} (CH aliphatisch); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.06 (s, 2H, OCH_2), 6.38-6.39 (m, 1H, ArH), 7.13 (dd, 1H, $J = 1.8/8.3$ Hz, ArH), 7.15-7.16 (m, 1H, ArH), 7.19 (dd, 1H, $J = 2.5/8.2$ Hz, ArH), 7.26 (ddd, 1H, $J = 0.8/7.7/7.7$ Hz, ArH), 7.37-7.42 (m, 4H, ArH) überlagert mit 7.44 (ddd, 1H, $J = 1.5/7.4/7.4$ Hz, ArH) überlagert mit 7.47 (dd, 1H, $J = 8.0/8.0$ Hz, ArH), 7.56 (m, 1H, ArH), 7.60 (dd, 1H, $J = 1.2/7.4$ Hz, ArH), 11.17 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.2 (OCH_2); 101.1, 111.0, 111.1 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 117.1 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.5$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 118.9, 120.4, 122.3, 126.0, 126.7, 128.2, 129.5, 130.3, 130.6 (tert. C); 123.8 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 127.5, 130.1 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 130.5, 133.3, 135.0, 143.2, 158.4 (quart. C).

5-{3-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenyl}-1*H*-indol (77d)



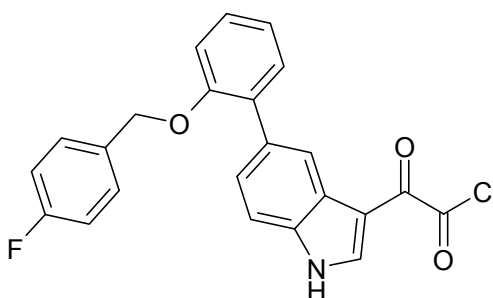
Nach AAV 8 aus 5-Brom-1*H*-indol (198 mg, 1.01 mmol), 3-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenylboronsäure (298 mg, 1.00 mmol), Natriumcarbonat (317 mg, 2.99 mmol), TBAB (323 mg, 1.00 mmol) und Palladium(II)acetat (1 mg, 0.004 mmol). Man erhält 250 mg (68%) gelbes Öl, welches ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

IR (NaCl): 3416 cm^{-1} (NH), 3025 cm^{-1} (CH aromatisch), 2960 cm^{-1} und 2867 cm^{-1} (CH aliphatisch); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.24 (s, 9H, CH_3), 2.22 (s, 3H, CH_3), 5.16 (s, 2H, OCH_2), 6.49-6.50 (m, 1H, ArH), 6.95 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.13 (ddd, 1H, $J = 0.5/2.6/8.7$ Hz, ArH), 7.18 (dd, 1H, $J = 0.8/2.7$ Hz, ArH), 7.37-7.41 (m, 3H, ArH), 7.45 (dd, 1H, $J = 7.5/7.5$ Hz, ArH), 7.48 (ddd, 1H, $J = 0.8/8.4/8.4$ Hz, ArH), 7.61 (ddd, 1H, $J = 1.5/1.5/7.7$ Hz, ArH), 7.74 (dd, 1H, $J = 1.5/1.5$ Hz, ArH), 7.82 (m, 1H, ArH), 11.18 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 16.4 (CH_3), 31.3 ($3 \times \text{CH}_3$), 69.1 (OCH_2); 101.4, 111.2, 111.7, 118.1, 120.2, 123.1, 125.0, 125.5, 125.9, 126.0, 127.4, 128.8 (tert. C); 33.6, 125.1, 128.1, 131.0, 135.4, 138.0, 141.9, 142.3, 154.1 (quart. C).

2-Oxo-2-(5-phenyl-1*H*-indol-3-yl)acetylchlorid (**78a**)

Nach AAV 9 aus Oxalylchlorid (106 μl , 1.23 mmol) und 5-Phenyl-1*H*-indol (**77a**; 171 mg, 0.885 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Man erhält 175 mg (70%) oranges Pulver. Das Produkt wird ohne Umkristallisation weiter verwendet.

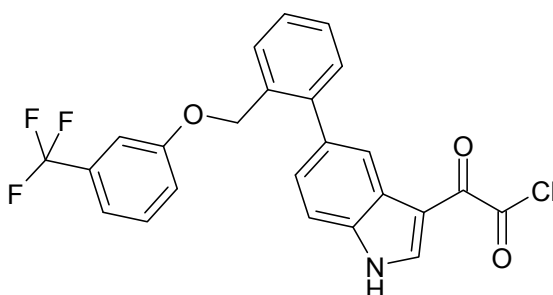
IR (KBr): 3189 cm^{-1} (NH), 3053 cm^{-1} und 3022 cm^{-1} (CH aromatisch), 2974 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} und 2906 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1777 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 7.37 (tt, 1H, J = 1.1/7.4 Hz, ArH), 7.48-7.51 (m, 2H, ArH), 7.60 (dd, 1H, J = 1.8/8.4 Hz, ArH), 7.65 (dd, 1H, J = 0.6/8.4 Hz, ArH), 7.67-7.68 (m, 2H, ArH), 8.43 (d, 1H, J = 1.8 Hz, ArH), 8.48 (d, 1H, J = 3.2 Hz, ArH), 12.53 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 113.1, 119.0, 123.0, 126.8, 126.9 (2C), 128.9 (2C), 138.5 (tert. C); 112.4, 126.1, 135.2, 136.1, 141.1, 165.2, 180.8 (quart. C).

2-(5-{2-[(4-Fluorbenzyl)oxy]phenyl}-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (**78b**)

Nach AAV 9 aus Oxalylchlorid (90 μl , 1.1 mmol) und 5-{2-[(4-Fluorbenzyl)oxy]phenyl}-1*H*-indol (**77b**; 237 mg, 0.747 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Man erhält 210 mg (69%) oranges Pulver. Das Produkt wird ohne Umkristallisation weiter verwendet.

Schmp.: 147-149 °C; IR (KBr): 3217 cm⁻¹ (NH), 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2938 cm⁻¹ und 2870 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1780 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.12 (s, 2H, OCH₂), 7.08 (ddd, 1H, *J* = 1.0/7.4/7.4 Hz, ArH), 7.10-7.14 (m, 2H, ArH), 7.22 (dd, 1H, *J* = 0.9/8.4 Hz, ArH), 7.34 (dd, 1H, *J* = 1.7/7.4 Hz, ArH) überlagert mit 7.36 (ddd, 1H, *J* = 1.7/7.4/7.4 Hz, ArH), 7.45 (dd, 1H, *J* = 1.7/8.4 Hz, ArH), 7.46-7.49 (m, 2H, ArH), 7.56 (dd, 1H, *J* = 0.6/8.3 Hz, ArH), 8.40 (m, 1H, ArH), 8.45 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, ArH), 12.43 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.7 (OCH₂); 112.0, 113.1, 114.9 (d, 2C, ²*J*_{C,F} = 21 Hz, C-CF), 121.1, 121.9, 125.3, 128.3, 129.4 (d, 2C, ³*J*_{C,F} = 8.1 Hz, C-C-CF), 130.8, 138.2 (tert. C); 112.3, 125.4, 130.9, 132.6, 133.3 (d, ⁴*J*_{C,F} = 2.9 Hz, C-C-C-CF), 135.6, 154.9, 161.4 (d, ¹*J*_{C,F} = 242 Hz, CF), 165.2, 180.7 (quart. C); C₂₃H₁₅ClFNO₃ (407.82); ber. C 67.74, H 3.71, N 3.43; gef. C 67.62, H 3.84, N 3.20.

2-Oxo-2-[5-(2-{[3-(trifluormethyl)phenoxy]methyl}phenyl)-1*H*-indol-3-yl]acetylchlorid
(78c)

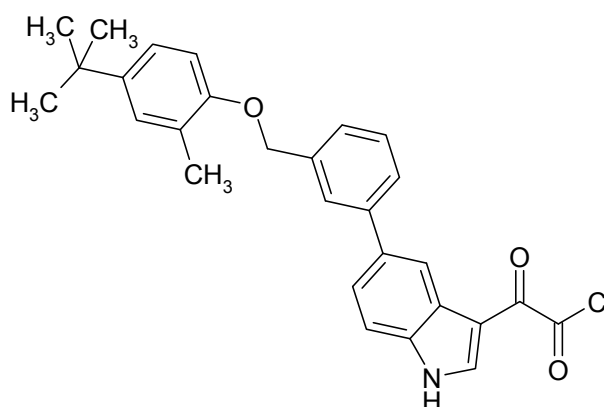


Nach AAV 9 aus Oxalylchlorid (138 µl, 1.61 mmol) und 5-(2-{[3-(Trifluormethyl)phenoxy]methyl}phenyl)-1*H*-indol (**77c**; 429 mg, 1.17 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Man erhält 248 mg (47%) gelbes Pulver. Das Produkt wird ohne Umkristallisation weiter verwendet.

Schmp.: 118-120 °C; IR (KBr): 3185 cm⁻¹ (NH), 1780 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 5.03 (s, 2H, OCH₂), 7.15 (m, 1H, ArH), 7.19 (dd, 1H, *J* = 2.4/8.3 Hz, ArH), 7.24 (ddd, 1H, *J* = 0.8/7.7/7.7 Hz, ArH), 7.34 (dd, 1H, *J* = 1.8/8.3 Hz, ArH), 7.39 (dd, 1H, *J* = 1.6/7.5 Hz, ArH), 7.45 (ddd, 2H, *J* = 1.7/7.4/7.4 Hz, ArH) überlagert mit 7.48 (ddd, 1H, *J* = 1.7/7.4/7.4 Hz, ArH), 7.56 (dd, 1H, *J* = 0.6/8.3 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, *J* = 1.3/7.4 Hz, ArH), 8.21 (m, 1H, ArH), 8.47 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz,

ArH), 12.48 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 68.2 (OCH₂); 111.3 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.7$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 112.2, 117.2 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 3.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}_3$), 118.9, 121.5, 124.7, 127.3, 128.4, 129.9, 130.3, 130.5, 138.4 (tert. C); 112.3, 123.8 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272$ Hz, $\underline{\text{CF}}_3$), 125.6, 130.1 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 133.3, 134.5, 135.8, 142.7, 158.3, 165.1, 180.6 (quart. C); C₂₄H₁₅ClF₃NO₃ (457.83); ber. C 62.96, H 3.30, N 3.06; gef. C 62.90, H 3.34, N 2.85.

2-(5-{3-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenyl}-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetylchlorid (78d)



Nach AAV 9 aus Oxalylchlorid (164 μl , 1.90 mmol) und 5-{3-[(4-*tert*-Butyl-2-methylphenoxy)methyl]phenyl}-1*H*-indol (**77d**; 503 mg, 1.36 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Man erhält 437 mg (70%) gelbes Pulver. Das Produkt wird ohne Umkristallisation weiter verwendet.

Schmp.: 174-180 °C; IR (KBr): 3185 cm^{-1} (NH), 3051 cm^{-1} (CH aromatisch), 2957 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} und 2863 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1778 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.24 (s, 9H, CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃), 5.20 (s, 2H, OCH₂), 6.96 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.14 (dd, 1H, $J = 2.5/8.5$ Hz, ArH), 7.19 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, ArH), 7.44-7.45 (m, 1H, ArH), 7.51 (dd, 1H, $J = 7.6/7.6$ Hz, ArH), 7.61 (dd, 1H, $J = 1.8/8.4$ Hz, ArH), 7.62-7.63 (m, 1H, ArH), 7.66 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 7.77 (m, 1H, ArH), 8.46 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, ArH), 8.48 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, ArH), 12.51 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 16.4 (CH₃), 31.3 (3xCH₃), 69.0 (OCH₂); 111.2 (2C), 113.1, 119.1, 122.9, 123.2, 125.6, 126.1, 127.5, 129.0, 138.6 (tert. C); 33.6,

112.5, 125.1, 126.2, 135.0, 136.2, 138.3, 141.1, 142.4, 154.0, 165.2, 180.8 (quart. C); $C_{28}H_{26}ClNO_3$ (459.96); ber. C 73.11, H 5.70, N 3.05; gef. C 73.00, H 5.50, N 2.72.

Anhang zu Abschnitt 8.2: Chemikalien mit besonderem Gefährdungspotential

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe sind unter Beachtung der einschlägigen Gefahrenhinweise und Sicherheitsregeln (R- und S-Sätze) zu handhaben. Beim Umgang mit den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten.

Anilin und seine Derivate

T(+) (Sehr) Giftig, N Umweltgefährdend

R 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68: Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Verdacht auf krebserzeugende Wirkung – Gefahr ernster Augenschäden – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich – Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken – Sehr giftig für Wasserorganismen – Irreversibler Schaden möglich.

S 26-27-36/37/39-45-46-61-63: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) – Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen – Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.

Dichlormethan

Xn Gesundheitsschädlich

R 40: Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.

S 23-24/25-36/37: Dampf nicht einatmen – Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Diethylether

F+ Hochentzündlich, Xn Gesundheitsschädlich

R 12-19-22-66-67: Hochentzündlich – Kann explosionsfähige Peroxide bilden – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen – Dämpfe können Schläfrigkeit oder Benommenheit verursachen.

S 9-16-29-33: Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.

Dimethoxyethan

F Leichtentzündlich, T Giftig

R 60-61-11-19-20: Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen – Kann das Kind im Mutterleib schädigen – Leichtentzündlich – Kann explosionsfähige Peroxide bilden – Gesundheitsschädlich beim Einatmen.

S 53-16-24/25-37-45: Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden – Geeignete Schutzhandschuhe tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

1,4-Dioxan

F Leichtentzündlich, Xn Gesundheitsschädlich

R 11-19-36/37-40-66: Leichtentzündlich – Kann explosionsgefährliche Peroxide bilden – Reizt die Augen und die Atmungsorgane – Verdacht auf krebserzeugende Wirkung – Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.

S 9-16-36/37-46: Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen – Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

Oxalylchlorid

T Giftig

R 14-23-29-34-37: Reagiert heftig mit Wasser – Giftig beim Einatmen – Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase – Verursacht Verätzungen – Reizt die Atmungsorgane.

S 26-36/37/39-45: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Ethylchlorformiat

F Leichtentzündlich, T + Sehr giftig

R 11-22-26-34: Leichtentzündlich – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Sehr giftig beim Einatmen – Verursacht Verätzungen.

S 9-16-26-28-33-36/37/39-45: Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren – Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Formaldehyd

T Giftig

R 20/21/22-36/37/38-39/23/24/25-40-43: Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut – Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken – Verdacht auf krebserzeugende Wirkung – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

S 26-36/37-45-51: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) – Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden.

Hydrazin-Monohydrat

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-23/24/25-34-43-50/53: Kann Krebs erzeugen – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.

S 53-45-60-61: Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) – Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Methanol

F Leichtentzündlich, T Giftig

R 11-23/24/25-39/23/24/25: Leichtentzündlich – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

S 7-16-36/37-45: Behälter dicht verschlossen halten – Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Phenylacetonitril und seine Derivate

T(+) (Sehr) Giftig

R 22-24-26: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken – Giftig bei Berührung mit der Haut – Sehr giftig beim Einatmen.

S 28-36/37-45: Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen – Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Phenylhydrazin und seine Derivate

T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-23/24/25-36/38-43-48/23/24/25-50-68: Kann Krebs erzeugen – Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut – Reizt die Augen und die Haut – Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich – Giftig: Gefahr ernster Gesund-

heitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berühren mit der Haut und durch Verschlucken – Sehr giftig für Wasserorganismen – Irreversibler Schaden möglich.

S 53-45-61: Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen) – Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Piperidin

F Leichtentzündlich, T Giftig

R 11-23/24-34: Leichtentzündlich – Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut – Verursacht Verätzungen.

S 16-26-27-45: Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren – Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich Etikett vorzeigen).

Tetrahydrofuran

F Leichtentzündlich, Xi Reizend

R 11-19-36/37: Leichtentzündlich – Kann explosionsgefährliche Peroxide bilden – Reizt die Augen und die Atmungsorgane.

S 16-29-33: Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen – Nicht in die Kanalisation gelangen lassen – Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.

8.3 Biologische Daten

8.3.1 Proteinkinase-Assay

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen sowie die kommerziell erworbenen Substanzen wurden bei der Firma ProQinase GmbH, Freiburg, auf ihre inhibitorische Aktivität an Proteinkinasen getestet.

In einem *in vitro* Proteinkinase-Assay wurden die IC₅₀-Profile gegenüber 8 bzw. 15 tumorrelevanten Kinasen sowie der physiologisch essentiellen Insulin-Rezeptor-Kinase (IR) generiert. Die verwendeten Proteinkinasen wurden in Sf9 Insektenzellen oder *E. coli* als humane rekombinante GST-fusion oder His-tagged Proteine exprimiert. Die anschließende Reinigung der Proteinkinasen erfolgte mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von GSH-Agarose (Sigma) oder Ni-NTH-Agarose (Qiagen). Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine SDS-PAGE mit Silberfärbung durchgeführt und die Identität jeder Proteinkinase mittels Massenspektrometrie festgestellt.

Die Bestimmung der Kinase-Aktivität erfolgte mit dem radiometrischen ³³PanQinase® Activity Assay. Unter Verwendung von radioaktiv markiertem [γ -³³P]-ATP wurde die Phosphorylierungsaktivität der jeweiligen Enzyme an den entsprechenden Substraten bestimmt. Dies erfolgte durch Messung des an das Substrat gebundenen γ -³³P. Je weniger γ -³³P gebunden ist, desto geringer ist die Aktivität eines Enzyms.

Alle Kinase-Assays wurden in 96-Well FlashPlates™ (Fa. Perkin Elmer/NEN, Boston, MA, USA) in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Zugabe der einzelnen Komponenten der Reaktionsmischung erfolgte in vier Schritten:

- 20 μ l Standardpuffer
- 5 μ l ATP-Lösung (in H₂O)
- 5 μ l Probelösung (in 10% DMSO)
- 20 μ l einer Mischung aus je 10 μ l Substrat- und Enzym-Lösung

Der Assay für jedes Enzym enthielt 60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-ortho-Vanadat, 1.2 mM DTT, 50 μ M PEG₂₀₀₀₀ sowie 1 μ M [γ -³³P]-ATP (ca. 5 x 10⁵ cpm/Well). Die Konzentrationen von Enzym und Substrat pro Well sind in Tabelle 7-1 aufgelistet.

Tabelle 8-1: Konzentrationen der im Assay getesteten Kinasen und ihrer Substrate

	Kinase	Kinase c [ng/50 µl]	Substrat	Substrat c [ng/50 µl]
1	AKT1	50	GSK3(14-21), Lot 007	1000
2	ARK5	100	RBER-CHKtide, Lot 022	1000
3	Aurora-B	100	Tetra(LRRWSLG)	500
4	AXL	50	Poly(Glu, Tyr) _{4:1}	125
5	B-RAF-VE	20	MEK1-KM, Lot 021	250
6	CK2-α1	50	Casein	1000
7	FAK	200	Poly(Glu, Tyr) _{4:1}	125
8	IGF-1R	20	Poly(Glu, Tyr) _{4:1}	125
9	IR	25	Poly(Ala, Glu, Lys, Tyr) _{6:2:5:1}	125
10	MET	100	Poly(Ala, Glu, Lys, Tyr) _{6:2:5:1}	125
11	PLK1	30	RBER-CHKtide, PR080711	2000
12	PRK1	200	Histone H2B	250
13	SAK	100	P38-alpha KA, Lot 001	2000
14	SRC	10	Poly(Glu, Tyr) _{4:1}	125
15	TRK-B	10	Poly(Glu, Tyr) _{4:1}	125
16	VEGFR-2	50	Poly(Glu, Tyr) _{4:1}	125

Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 30 °C wurde die Reaktion mit 50 µl einer 2%igen (v/v) Phosphorsäure gestoppt und die Platten zweimal mit je 200 µl 0.9%iger (w/v) Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Einlagerung von ³³P wurde mit Hilfe eines Mikroplatten-Szintillationszählers (Microbeta, Trilux, Wallac) bestimmt. Die Durchführung sämtlicher Assays erfolgte mit einem BeckmanCoulter/Sagian Roboter System.

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte auf Basis der Restaktivitäten der Proteinkinasen. Um diese ermitteln zu können, benötigt man zusätzlich eine *low control* und eine *high control*. Bei der *low control* handelt es sich um Kontrollproben, die nur Substrat, aber weder Enzym noch Inhibitor enthalten. Dieser Messwert repräsentiert die unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Mikrotiterplatte. Die *high control* wird mit Proben ermittelt, die Substrat und Enzym, aber keinen Inhibitor enthalten. Sie

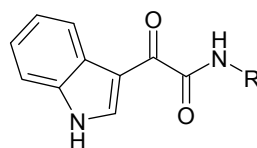
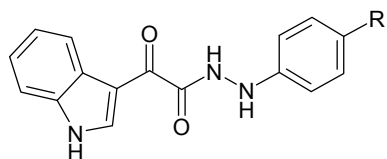
repräsentiert die uneingeschränkte Enzymaktivität. Die Differenz von *high control* und *low control* ergibt die absolute Enzymaktivität und wird mit 100% gleichgesetzt. Die Ermittlung der Restaktivität erfolgt schließlich nach der Gleichung:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebnis mit Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100\%$$

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden jeweils 10 Konzentrationen der Verbindungen im Bereich von 100 µM bis 3 nM einmalig vermessen. Mit Hilfe des Programms Quattro Workflow V2.3.1 (Quattro Research GmbH, München) konnten aus diesen Daten die IC₅₀-Werte berechnet werden.

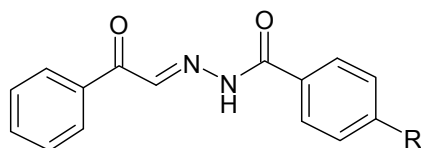
Als Parameter für die Assay-Qualität wurde der Z'-Faktor der Kontrollproben für jede Mikrotiterplatte (n = 8) ermittelt.¹⁶⁶ Z'-Faktoren unter 0.4 erfordern nach intern festgelegten Kriterien eine Wiederholung der Messung. Da in keinem Assay der Z'-Faktor kleiner als 0.43 und meist größer als 0.60 war, ist von einer guten bis exzellenten Assay-Qualität auszugehen.

Nachfolgend sind tabellarisch (Tabellen 8-2 bis 8-9) die IC₅₀-Werte aller getesteten Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 8-2: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **15**, **16** und **17**^a**15a:** R = H**15b:** R = Cl**15c:** R = Br**15d:** R = I**16a:** R = CH₂-Ph**16b:** R = CH₂-(4-CH₃-Ph)**16c:** R = CH₂-(4-Cl-Ph)**16d:** R = CH₂-(3-Cl-Ph)**17a:** R = CH₂CH₂-(4-CH₃-Ph)**17b:** R = CH₂CH₂-(3,4-OCH₃-Ph)**17c:** R = CH₂CH₂-(4-Cl-Ph)**17d:** R = CH₂CH₂-(3-Cl-Ph)

	15a	15b	15c	15d	16a	16b	16c	16d	17a	17b	17c	17d
AKT1	n.b.											
ARK5												
Aurora-B				91								
AXL	n.b.											
B-RAF-VE									57			
CK2-α1												
FAK									91			
IGF-1R						63			52			
IR	n.b.											
MET												
PLK1	n.b.											
PRK1												
SAK												
SRC												
TRK-B												
VEGFR-2												

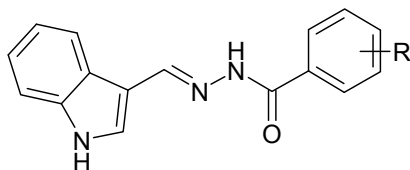
^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μM; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 8-3: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **18**^a

18a: R = H
18b: R = CH₃
18c: R = CF₃
18d: R = Cl
18e: R = NO₂

	18a	18b	18c	18d	18e
AKT1	n.b.				85
ARK5					98
Aurora-B			50	51	72
AXL	n.b.				24
B-RAF-VE			33	50	44
CK2-α1					
FAK	70		70		68
IGF-1R		98	61	18	17
IR	n.b.				
MET			46	56	42
PLK1	n.b.				84
PRK1					32
SAK					41
SRC					25
TRK-B					20
VEGFR-2			16	28	27

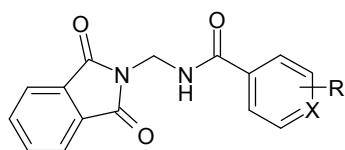
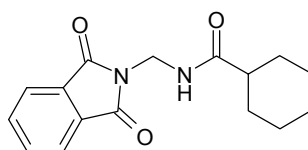
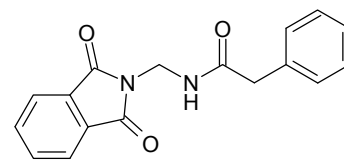
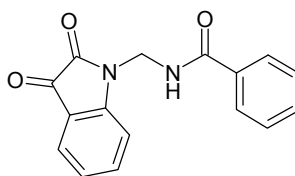
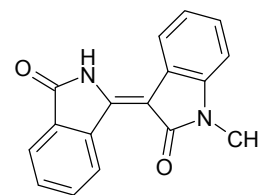
^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μM; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 8-4: IC₅₀-Werte [μ M] der Verbindungen **19**^a

19a:	R = H	19i:	R = 4-NH ₂
19b:	R = 2-CH ₃	19j:	R = 3-NO ₂
19c:	R = 4-CH ₃	19k:	R = 4-NO ₂
19d:	R = 4-C(CH ₃) ₃	19l:	R = 2-Cl
19e:	R = 4-Ph	19m:	R = 3-Cl
19f:	R = 4-OCH ₃	19n:	R = 4-Cl
19g:	R = 3,5-OCH ₃	19o:	R = 4-Br
19h:	R = 3,4-OH		

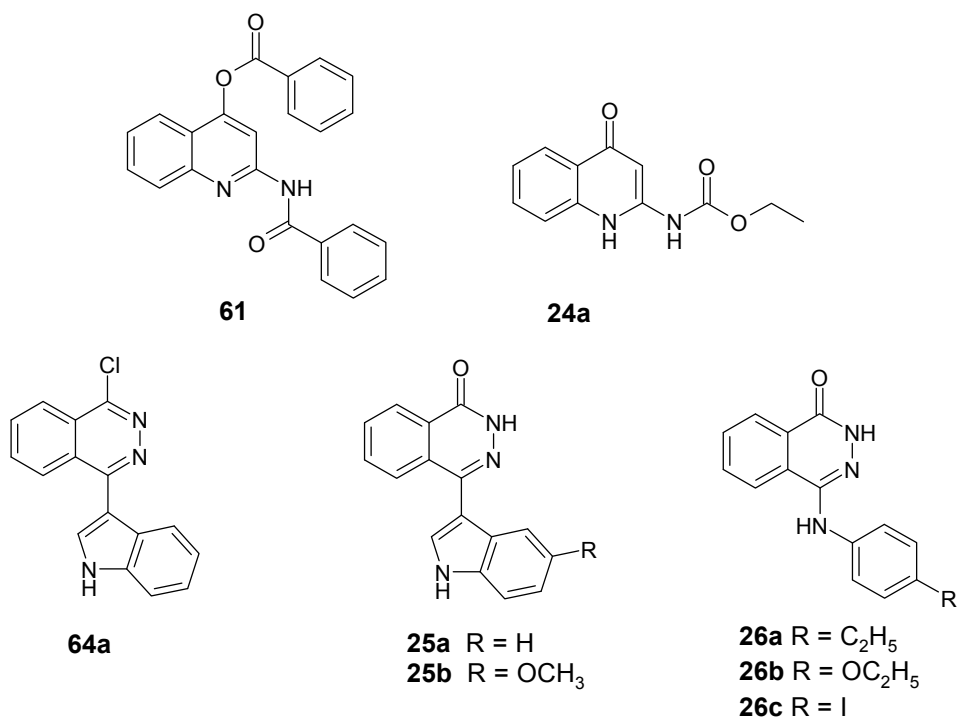
	19a	19b	19c	19d	19e	19f	19g	19h	19i	19j	19k	19l	19m	19n	19o
AKT1	n.b.														
ARK5															
Aurora-B								74							45
AXL	n.b.														
B-RAF-VE								53							
CK2-α1															
FAK	96		69				92	67		81					
IGF-1R					87										
IR	n.b.														
MET								76							
PLK1	n.b.														
PRK1															
SAK															
SRC															
TRK-B															
VEGFR-2	89			95				68							

^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μ M; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 8-5: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **21**, **22** und **23a**^a**21a:** R = H X = C**21b:** R = 4-CH₃ X = C**21c:** R = 3-CH₃ X = C**21d:** R = 4-CF₃ X = C**21e:** R = H X = N**21f****21g****22****23a**

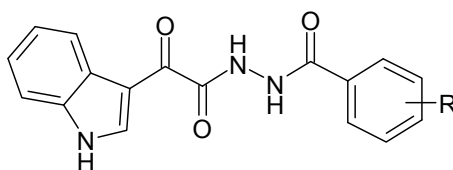
	21a	21b	21c	21d	21e	21f	21g	22	23a
AKT1									
ARK5									73
Aurora-B									45
AXL									31
B-RAF-VE									
CK2-α1									
FAK								50	11
IGF-1R						82		66	32
IR									
MET									49
PLK1									
PRK1									
SAK									26
SRC						65		47	
TRK-B						31		26	
VEGFR-2								64	

^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μM; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 8-6: IC₅₀-Werte [μ M] der Verbindungen **61**, **24a**, **64a**, **25** und **26**^a

	61	24a	64a	25a	25b	26a	26b	26c
AKT1			n.b.					
ARK5								
Aurora-B	38			59				
AXL			n.b.					
B-RAF-VE				15				90
CK2-α1								
FAK				61				
IGF-1R	33							
IR			n.b.					
MET								
PLK1			n.b.					
PRK1								
SAK	44							
SRC	93							
TRK-B	39							
VEGFR-2								

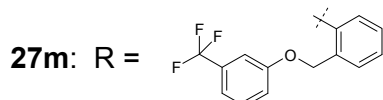
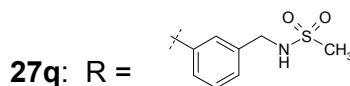
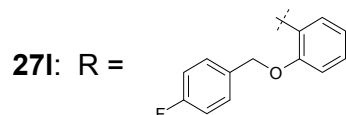
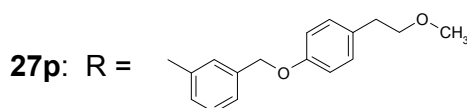
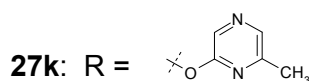
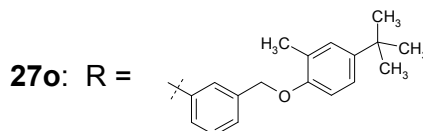
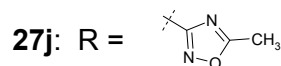
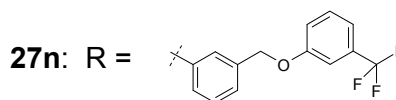
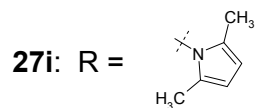
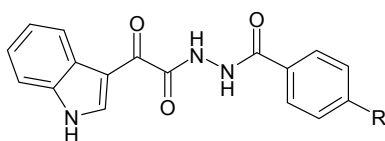
^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μ M; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 8-7: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **27a-h**^{a, b}

27a:	R = H	27e:	R = 4-CF ₃
27b:	R = 4-CH ₃	27f:	R = 4-Cl
27c:	R = 4-OCH ₃	27g:	R = 4-I
27d:	R = 4-(CH ₃) ₃	27h:	R = 2-F

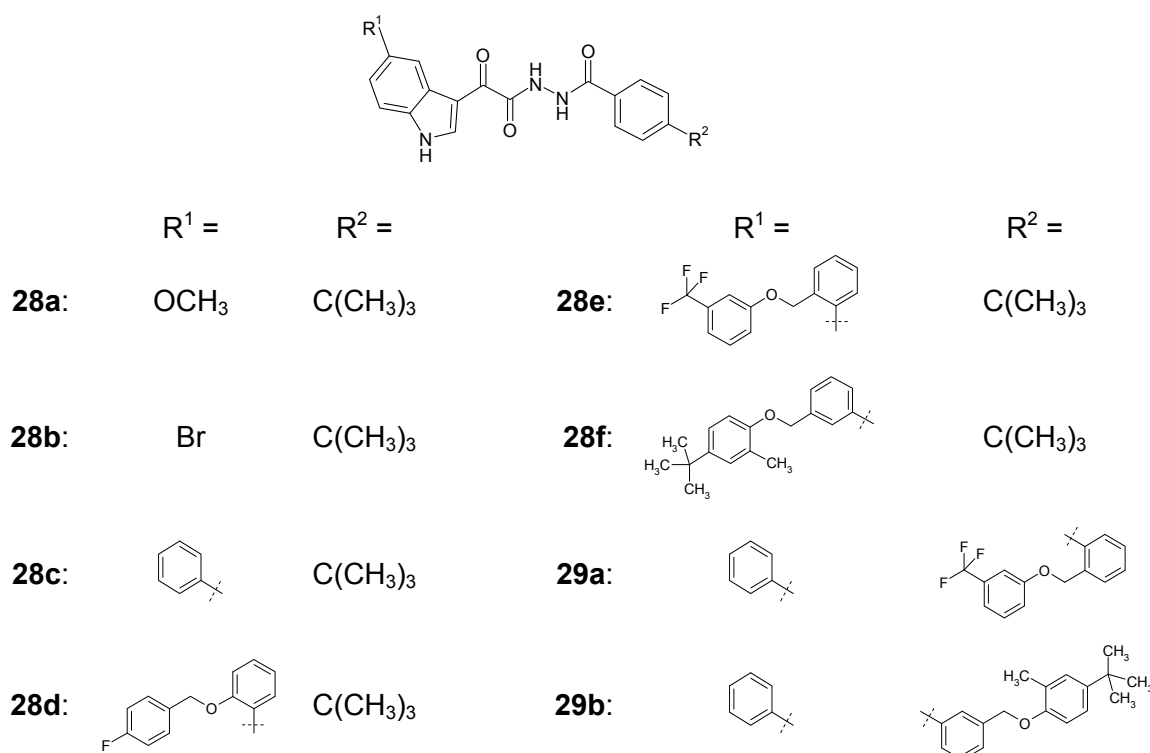
	27a	27b	27c	27d	27e	27f	27g	27h
AKT1	n.b.			91	n.b.			
ARK5								
Aurora-B			96	78	72	77	53	
AXL	n.b.			13	n.b.		12	
B-RAF-VE		90	53	48	15	32	25	
CK2-α1								
FAK				83			35	
IGF-1R		82	54	4.9/3.9	6.8/1.4	16	4.0/4.1	91
IR	n.b.				n.b.		18	
MET		95	96	36	49	48	14	
PLK1	n.b.				n.b.		37	
PRK1				10			19	
SAK				41			19	
SRC				8.3/3.4	1.3	5.4/3.5	96	
TRK-B				9.6/5.3	1.3	5.8/5.9	47	
VEGFR-2		91	89	26	18	24	7.0	

^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μM; n.b.: nicht bestimmt^b IC₅₀-Werte aus zwei voneinander unabhängigen Testungen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

Tabelle 8-8: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **27i-q**^{a, b}

	27i	27j	27k	27l	27m	27n	27o	27p	27q
AKT1	33	96			46		42	10	28
ARK5	74	83		65					
Aurora-B	37			26	42	60	31	98	90
AXL	8.8	89		13	6.1	9.0	4.3	4.1	7.6
B-RAF-VE	16	72	71	14	13	23	14	23	7.5
CK2-α1	38								
FAK	19			61	25	12	94	6.2	10
IGF-1R	5.5/4.3	12	31	3.8/6.0	0.75/0.87	1.3/0.68	0.68/0.65	0.75/0.61	3.1/3.4
IR	12	93		12	3.7	6.9	3.7	7.4	16
MET	16	95		13	5.2	7.6	4.1	8.8	27
PLK1	22	50		26	22	19	11		35
PRK1	8.0			11	5.8	34	4.3		56
SAK	12	48	65	10	11	19	5.1	37	13
SRC	4.2/3.0	22	40	2.2/1.5	0.85/0.38	0.92/0.51	0.63/0.40	0.44/0.32	2.6/2.9
TRK-B	4.2/6.2	16	29	2.6/2.8	0.76/1.0	2.0/1.1	0.49/0.90	2.4/0.58	4.9/11
VEGFR-2	6.2	28	90	3.6	1.6	2.2	1.6	0.89	2.5

^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μM.^b IC₅₀-Werte aus zwei voneinander unabhängigen Testungen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

Tabelle 8-9: IC₅₀-Werte [μM] der Verbindungen **28** und **29**^{a, b}

	28a	28b	28c	28d	28e	28f	29a	29b
AKT1			53	65	66	15		
ARK5			55	71	95	25		
Aurora-B			8.4		71	63		72
AXL		60	9.9		74	17		16
B-RAF-VE		90	25	61	19	23	80	10
CK2-α1						96		80
FAK		34	78	90	33	11		11
IGF-1R	58	4.3/1.1	6.1/6.1		10/3.0	2.8/0.94		1.2/0.49
IR			15	12	10	6.6		5.0
MET			16		25	14		7.6
PLK1			57	25	20	5.4		13
PRK1			25	30	37	13		17
SAK			14	14	13	11		13
SRC	58	3.2/0.89	4.6/4.1	24	2.9/2.1	0.95/0.43		0.44/0.32
TRK-B	30	7.5/1.2	4.8/10	11	8.6/21	1.6/1.5		0.57/0.77
VEGFR-2	75	11	7.0	89	6.9	2.5		1.3

^a Fehlende Werte stehen für IC₅₀-Werte > 100 μM.^b IC₅₀-Werte aus zwei voneinander unabhängigen Testungen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

8.3.2 ELISA-Autophosphorylierungs-Assay

Die Verbindungen **27-29** zeigten im *in vitro* Proteinkinase-Assay gegenüber SRC die höchsten inhibitorischen Aktivitäten. Als aktivste Vertreter wurden deswegen **27m**, **27o** und **27p** zusätzlich einem SRC-spezifischen zellulären Phosphorylierungsassay unterzogen. Auch dieser Assay wurde bei der Firma ProQinase GmbH, Freiburg, durchgeführt.

Für den Assay wurden SRC-exprimierende MefToff cSrc Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um transfizierte embryonale Maus-Fibroblasten (Mef), die das vollständige SRC Protein exprimieren.

Zur Bestimmung der zellulären IC₅₀-Werte wurden die Zellen in einer Zweifachbestimmung jeweils für 90 min mit 8 unterschiedlichen Konzentrationen der Verbindungen inkubiert. Nach anschließender Zelllyse erfolgte die Bestimmung der Autophosphorylierung von SRC an pY419 mit einem von ProQinase entwickelten Festphasen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Aus der hierbei ermittelten Absorption wurde mithilfe einer *high control* und einer *low control* der prozentuale Phosphorylierungsgrad bestimmt. Als *high control* (= 100%) dienten mit DMSO behandelte (= nicht inhibierte) Zellen, als *low control* (= 0%) fungierten Zellen, die mit dem etablierten Multi-kinase-Inhibitor Dasatinib behandelt wurden (c = 1 µM).

Unter der Voraussetzung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung erfolgte die Berechnung der zellulären IC₅₀-Werte mit dem Programm Prism 5. Dies war ausschließlich für Dasatinib möglich. Keine der in diesem Assay getesteten Verbindungen **27m**, **27o** und **27p** zeigte eine signifikante zelluläre Aktivität.

Als Parameter für die Assay-Qualität wurde der Z'-Faktor ermittelt.¹⁶⁶ Z'-Faktoren unter 0.4 erfordern nach intern festgelegten Kriterien eine Wiederholung der Messung. Der Z'-Faktor war in allen Fällen größer als 0.4.

8.3.3 Tumorzelllinien-Assay

27m, **27o**, **28f** und **29b**, die im *in vitro* Proteinkinase-Assay vielversprechende IC₅₀-Profile gezeigt haben, wurden im Rahmen des *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) am *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität getestet. Das Screening umfasste ca. 60 humane Tumorzelllinien, die ver-

schiedene Krebsformen bzw. organspezifische Tumore repräsentieren. Dazu gehören Leukämie, Melanome, nicht kleinzelliger Lungenkrebs, Darm-, Nieren- und Ovarialkrebs sowie Tumore der Brust, der Prostata und des zentralen Nervensystems. Tabelle 8-10 enthält eine genaue Auflistung der verwendeten Zelllinien. Zunächst erfolgte die Evaluierung aller Verbindungen bei einer Testkonzentration von 10 μ M (*single dose*). Das Ergebnis wird in einem *one dose mean graph* präsentiert. Hierbei wird das Zellwachstum der einzelnen Zelllinien sowie das mittlere Zellwachstum aller Zelllinien gegenüber nicht behandelten Kontrollzelllinien in Prozent angegeben. Eine Abbildung eines solchen *one dose mean graph* sowie weitere Erläuterungen dazu findet sich in Kapitel 5.4.3.

Die verwendeten Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit 5% fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin entwickelt. Für das Screening wurden 96-Well Mikrotiterplatten mit den Zellen beimpft, wobei in Abhängigkeit der Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie Zelldichten zwischen 5000 und 40000 Zellen/Well erreicht wurden. Die Mikrotiterplatten wurden zunächst in Abwesenheit der Testverbindungen für 24 h inkubiert, anschließend mit einer Lösung der zu testenden Substanz in DMSO versetzt und weitere 48 h inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen fixiert und gewaschen. Die Bestimmung der Zellmasse erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe des Farbstoffs Sulforhodamin B, der an basische Aminosäurereste in Proteinen bindet. In den Mikrotiterplatten fixierte Zellen können somit angefärbt und quantifiziert werden. Hieraus lässt sich das Zellwachstum ermitteln.

Verbindungen, die in der ersten Testung eine signifikante Hemmung des Zellwachstums zeigen, werden anschließend bei fünf verschiedenen Konzentrationen erneut evaluiert, um GI_{50} (*growth inhibition 50%*), TGI (*total growth inhibition*) und LC_{50} (*lethal concentration 50%*) zu bestimmen. Die Ergebnisse der ersten Evaluierung der Verbindungen **27m**, **27o**, **28f** und **29b** bei einer Testkonzentration von 10 μ M sind in Tabelle 8-10 aufgeführt. Aufgrund der zu geringen mittleren Wachstumshemmung der Zelllinien wurden keine weiteren Testungen durchgeführt. Ergänzend dazu sind in den Abbildungen 8-1 und 8-2 die Expressionslevel von SRC und IGF-1R bezogen auf ihre jeweilige mittlere Expression in allen 60 Zelllinien des IVCLSP dargestellt. Zeigt ein Balken nach rechts, konnte eine erhöhte Expression der Kinase festgestellt werden, weist ein Balken nach links, wurde eine vergleichsweise geringere Expression dieser

Kinase in der Zelllinie ermittelt. Das Expressionsmuster von TRK-B ist nicht aufgeführt, da TRK-B mit Ausnahme von SK-OV-3 in allen Zelllinien gleichermaßen exprimiert wird. Für VEGFR-2 liegen keine Daten vor.

Tabelle 8-10: Zellwachstum [%] nach Inkubation mit den Verbindungen **27m**, **27o**, **28f** und **29b**^a (Testkonzentration: 10 µM)

Zelllinie	27m	27o	28f	29b
Leukämie				
CCRF-CEM	69.66	n.b.	79.40	86.14
HL-60(TB)	101.49	99.34	92.08	128.50
K-562	62.01	50.32	79.75	105.46
MOLT-4	64.64	81.48	71.67	105.74
RPMI-8226	87.75	89.22	73.20	98.00
SR	56.79	47.41	108.18	99.72
NSCLC				
A549/ATCC	52.01	7.38	91.34	103.49
EKVX	94.99	107.93	91.95	99.06
HOP-62	95.12	87.73	122.28	102.10
HOP-92	77.16	100.13	95.92	102.34
NCI-H226	88.71	89.24	81.74	100.44
NCI-H23	87.31	80.22	81.13	95.24
NCI-H322M	89.44	92.06	105.96	105.09
NCI-H460	85.92	67.23	93.59	110.39
NCI-H522	7.08	-7.70	57.12	57.57
Darmkrebs				
COLO 205	83.37	115.09	104.93	100.37
HCC-2998	95.37	105.40	101.70	97.02
HCT-116	67.48	68.29	68.97	80.09
HCT-15	105.00	109.88	101.58	98.30
HT29	88.19	107.41	102.06	110.41
KM12	76.17	97.62	102.67	95.29
SW-620	49.22	96.68	107.65	93.82
Prostatakrebs				
PC-3	73.09	67.66	85.93	92.05
DU-145	84.91	55.56	100.76	82.32
ZNS-Krebs				
SF-268	85.46	59.37	94.84	89.11
SF-295	105.68	108.81	97.40	105.25
SF-539	100.62	65.39	88.55	87.13
SNB-19	91.65	94.82	100.85	100.91
U251	65.14	33.46	91.79	91.28

^a n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 8-10: Zellwachstum [%] nach Inkubation mit den Verbindungen **27m**, **27o**, **28f** und **29b**^a (Testkonzentration: 10 µM) (Fortsetzung)

Zelllinie	27m	27o	28f	29b
Melanom				
LOX IMVI	77.35	74.13	90.45	97.05
MALME-3M	95.58	84.29	100.25	95.64
M14	83.94	64.85	89.14	99.88
MDA-MB-435	102.05	81.08	97.83	110.36
SK-MEL-2	90.86	79.35	112.02	114.76
SK-MEL-28	105.90	84.06	95.40	114.97
SK-MEL-5	100.97	88.46	76.40	98.75
UACC-257	95.84	79.92	114.77	123.60
UACC-62	95.11	90.63	88.70	93.26
Ovarialkrebs				
IGROV1	80.26	98.79	98.26	94.47
OVCAR-3	110.18	98.87	101.47	102.97
OVCAR-4	91.74	100.79	72.71	87.30
OVCAR-5	98.35	101.67	105.97	97.99
OVCAR-8	46.06	-9.59	98.72	87.73
NCI/ADR-RES	84.69	34.42	95.44	93.93
SK-OV-3	88.43	106.74	101.74	100.90
Nierenkrebs				
786-0	87.27	65.26	101.20	99.98
A498	103.56	114.51	92.25	109.62
ACHN	97.73	93.87	90.12	100.12
CAKI-1	82.05	89.10	86.16	94.69
RXF 393	106.95	83.75	107.61	109.88
SN12C	81.73	91.93	83.88	87.85
TK-10	85.05	112.45	107.00	112.57
UO-31	51.83	85.11	82.68	76.03
Brustkrebs				
MCF7	78.57	100.10	88.83	96.73
MDA-MB-	90.00	86.18	107.80	104.21
HS 578T	94.15	57.59	103.47	98.28
BT-549	n.b.	n.b.	89.09	99.29
T-47D	78.96	92.04	70.41	88.49
MDA-MB-468	101.63	11.87	95.11	111.45
Mittleres Zellwachstum	84.11	81.05	93.56	98.73

^a n.b.: nicht bestimmt

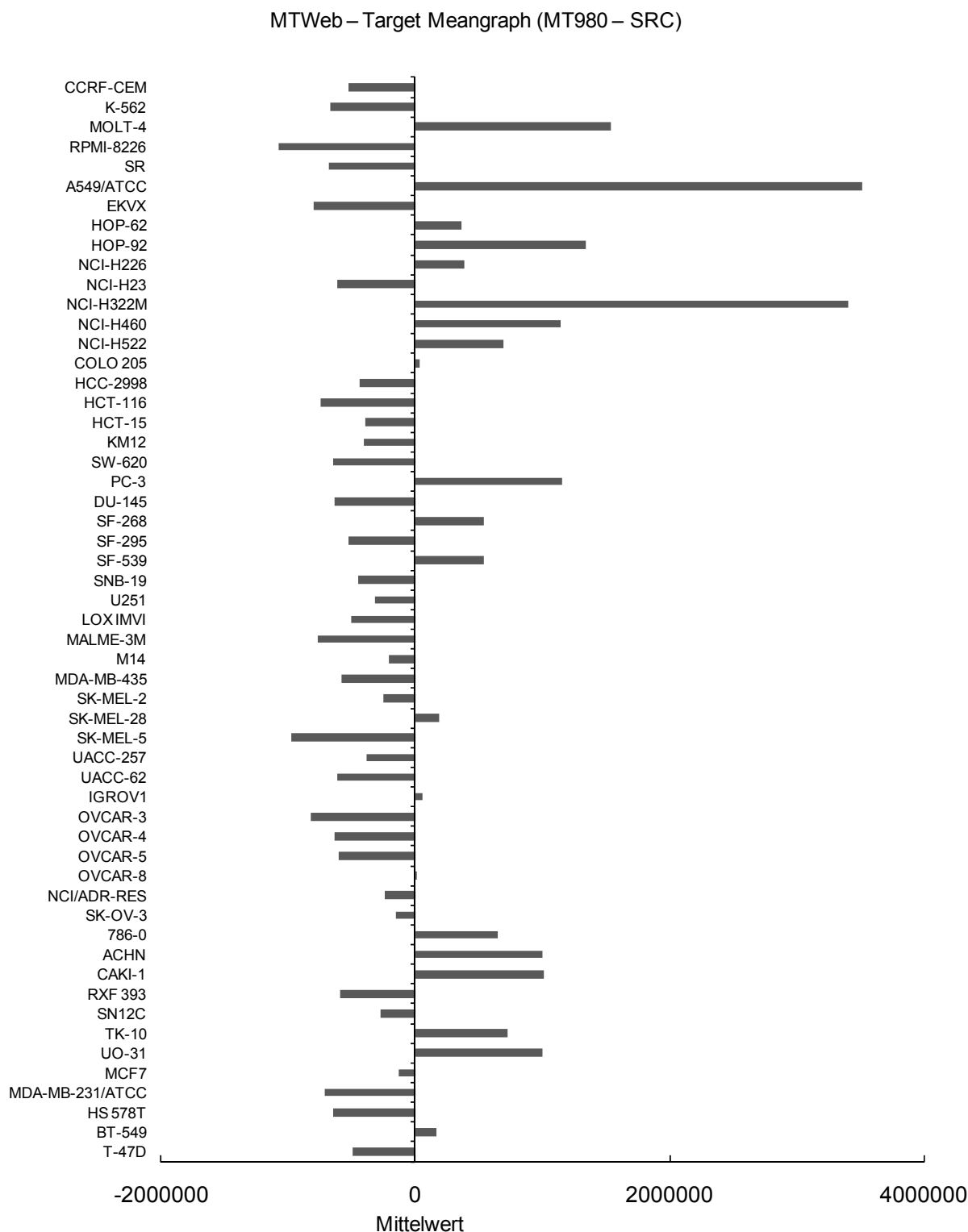


Abbildung 8-1: Relatives Expressionslevel von SRC in den Zelllinien des IVCLSP

(Die Ermittlung der Daten erfolgte mithilfe der *Molecular Target Data Application* des *Developmental Therapeutics Program* des NCI.¹⁵²⁾

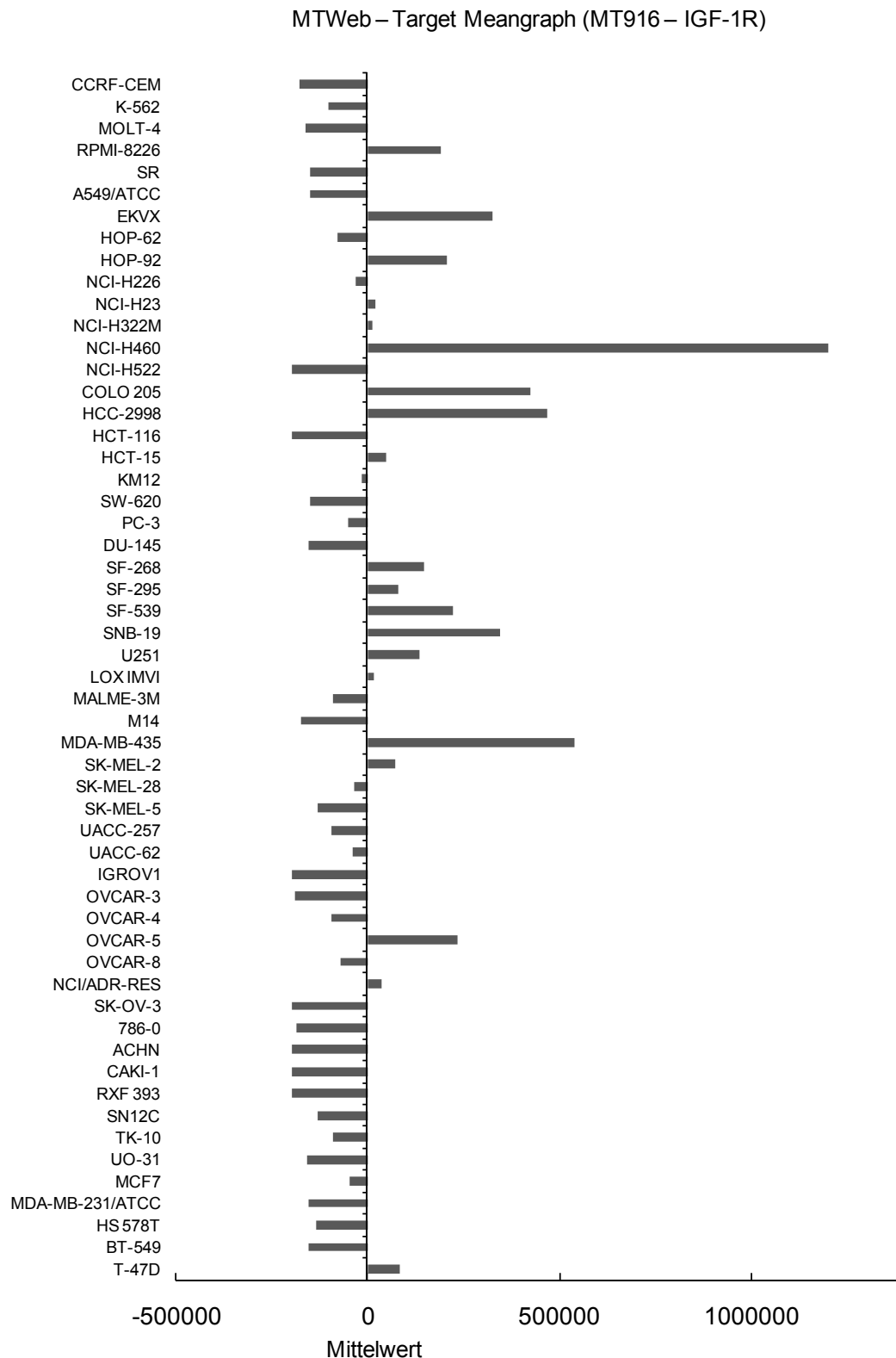


Abbildung 8-2: Relatives Expressionslevel von IGF-1R in den Zelllinien des IVCLSP

(Die Ermittlung der Daten erfolgte mithilfe der *Molecular Target Data Application* des *Developmental Therapeutics Program* des NCI.¹⁵²⁾

8.4 Durchführung der Docking-Studien

8.4.1 Docking mit FlexX

Das Docking im Rahmen des diesem Projekt zugrunde liegenden virtuellen Screenings sowie die Docking-Experimente zur Untersuchung des Bindungsmodus der Verbindungen **21** bis **26** in c-MET wurden mit dem Programm FlexX, BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, durchgeführt.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

8.4.1.1 Struktur-basiertes virtuelles Screening

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war das Ergebnis eines virtuellen Screenings, bei dem kommerziell verfügbare Strukturen mit Hilfe des Docking-Programms FlexX in die ATP-Bindetasche der c-MET Kinase eingepasst wurden. Das virtuelle Screening wurde von Dr. Thomas Lemcke (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) und Prof. Dr. Matthias Rarey (Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg) durchgeführt. Als dreidimensionales Modell der Zielstruktur diente die Röntgenkristallstruktur einer DFG-in/ α C-out-Konformation von c-MET (PDB-ID: 1r0p⁷⁴).

Auswahl und Vorbereitung der Strukturen

Das virtuelle Screening erfolgte auf Basis der ZINC Datenbank.⁷⁵ Es handelt sich dabei um eine frei zugängliche Datenbank (ZINC ist das Akronym für „ZINC is not commercial“) mit kommerziell verfügbaren Substanzen. Zum Zeitpunkt des virtuellen Screenings standen ca. 3 Mio. kommerziell verfügbare Substanzen in der Datenbank zur Verfügung (Stand 08/2004), von denen viele als *drug*- oder *lead-like*¹⁷⁰ einzustufen sind. Die Strukturen sind in diversen 3D-Formaten, die unterschiedliche Konformationen, Protonierungszustände und tautomere Formen einschließen, verfügbar und direkt in vielen Docking-Programmen einsetzbar. Die in der Datenbank hinterlegten Verbindungen sind zudem mit diversen Eigenschaften wie relative Molmasse, cLogP-Werten, Zahl der Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren und Zahl der rotierbaren Bindungen versehen, so dass je nach Anspruch und Fragestellung des virtuellen Screenings von Beginn an gewisse Kriterien, wie z. B. die Lipinski-Regeln (*Lipinski rule of 5*)¹⁷¹, festgelegt werden können.⁷⁵ Letztere wurden in diesem Fall als Kriterium für eine Vorauswahl von Substanzen verwendet, wodurch die Zahl der Verbindungen auf 1.7 Mio. reduziert wurde. Um spätere strukturelle Variationsmöglichkeiten zu gewähr-

leisten, erfolgte eine weitere Einschränkung auf Verbindungen mit folgenden Kriterien: Molekulargewicht < 400, logP < 4, HDon < 10, HAcc < 5, Zahl der rotierbaren Bindungen < 8. Daraus resultierten ca. 1 Mio. Strukturen, die nach Überführung in 3D-Strukturen mithilfe des Programms CORINA¹⁷² mit FlexX 2.0 in die ATP-Bindetasche der c-MET Kinase gedockt wurden.

Vorbereitung des Proteins

Das Protein wurde mit den Standardeinstellungen in FlexX vorbereitet. Die Bindetasche wurde mit 6.5 Å um den ursprünglich kristallisierten Liganden definiert. Wassermoleküle wurden nicht mit einbezogen.

Screening

Das Screening erfolgte mit den Standardeinstellungen von FlexX. Eine erste Bewertung erfolgte auf Basis der in FlexX integrierten Scoring-Funktion.¹⁶⁹ Um relative Distanzen innerhalb der Bindetasche als weiteren Parameter zur Beurteilung der Docking-Posen bestimmen zu können, wurden die Koordinaten des Schwerpunktes des ursprünglichen Inhibitors als Bezugspunkt festgelegt. Die Distanz von diesem Bezugspunkt zum Schwerpunkt einer gedockten Verbindung erlaubt Rückschlüsse auf die räumliche Lage dieser Struktur in der Bindetasche. Nur 28 der 208 Topscore-Verbindungen wiesen eine maximale Distanz von 3 Å zum Bezugspunkt auf. Eine manuelle Betrachtung der Hits und ihrer Docking-Posen zeigte zudem, dass lediglich 24 Verbindungen eine Wasserstoffbrücke zur Hinge-Region ausbilden.

Aus diesem Grund wurde ein zweites Screening mit einem Kinase-Pharmakophoren-Constraint durchgeführt, welches Verbindungen eliminiert, die keine Wasserstoffbrücken zur Hinge-Region ausbilden können. Das Pharmakophoren-Constraint umfasste die NH-Funktion von Met1160 als Donor sowie optional die Sauerstoffatome von Met1160 und Pro1158 als Akzeptor. Hierbei handelt es sich um Aminosäuren der Hinge-Region von c-MET. Alle weiteren Parameter wurden beibehalten. Aus diesem Screening resultierten ca. 350.000 Verbindungen, die mindestens eine Wasserstoffbrücke zur Hinge-Region aufwiesen. Auf Basis der Scoring-Werte, der Distanzen zum Bezugspunkt und der Masse der Verbindungen erfolgte eine Clusterung der Substanzen, woraus schließlich eine Gruppe von 107 potentiellen c-MET Inhibitoren hervorging. 57 Verbindungen konnten kommerziell erworben und in einem 8 Proteinkinasen umfassenden Assay auf ihre tatsächliche inhibitorische Aktivität getestet werden.

8.4.1.2 Docking-Experimente zur Untersuchung des Bindungsmodus der Verbindungen 21-26 in c-MET

Auswahl der Röntgenkristallstrukturen

Die c-MET Kristallstrukturen 1r0p⁷⁴, 2rfn¹⁵⁰ und 2rfs¹⁵⁰ wurden miteinander verglichen und zunächst Re- bzw. Crossdocking-Experimenten unterzogen. Auf diese Weise sollte eine für die Docking-Studien geeignete Röntgenkristallstruktur gefunden und die Eignung des Docking-Programms überprüft werden.

Das Re- bzw. Crossdocking erfolgte mit der Standalone-Version von FlexX 2.2.1 ohne die Verknüpfung mit CORINA¹⁷². Die verschiedenen Röntgenkristallstrukturen wurden zunächst nach Extraktion der jeweiligen Liganden auf Basis aller gemeinsamen C_α-Atome überlagert. Das Docking wurde jeweils ohne bzw. mit dem unter 8.4.1.1 beschriebenen Pharmakophoren-Constraint durchgeführt. Die Liganden wurden zunächst mit Gasteiger-Hückel-Ladungen versehen und mit dem Tripos-Kraftfeld minimiert.

Tabelle 8-11: RMSD der Top-Lösung des Re- bzw. Crossdockings

Ligand Rezeptor	ohne Pharmakophor			mit Pharmakophor		
	1r0p	2rfn	2rfs	1r0p	2rfn	2rfs
1r0p	0.773	17.567	9.096	0.773	k.L.	k.L.
2rfn	5.975	15.604	12.873	5.975	k.L.	k.L.
2rfs	6.142	23.036	1.449	6.142	10.425	1.449

k.L.: keine Lösung gefunden

Mit Ausnahme von 2rfn konnten sowohl mit als auch ohne Pharmakophoren-Constraint gute Ergebnisse im Redocking erzielt werden (Tabelle 8-11). Das Crossdocking führte wiederum zu sehr schlechten Ergebnissen, bei denen die erhaltenen Posen der Liganden komplett von denen aus ihren ursprünglichen Bindetaschen abwichen. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte keine der Bindetaschen als „allround“-Bindetasche identifiziert werden. Das Docking wurde deshalb sowohl mit 1r0p als auch 2rfs

durchgeführt. 2rfn wurde aufgrund der nicht vollständig aufgelösten Struktur nicht verwendet.

Vorbereitung der Liganden

Bevor die Verbindungen mit dem vorher definierten Pharmakophoren-Constraint in die Bindetaschen gedockt wurden, wurden sie zunächst in Sybyl 7.0¹⁷³ aufgebaut, mit AM1-Ladungen versehen und mit dem Tripos-Kraftfeld minimiert.

Vorbereitung der Proteine

Die Vorbereitung erfolgte in gleicher Weise wie in Abschnitt 8.4.1.1 beschrieben.

Docking

Das Docking wurde mit FlexX 2.2.1 durchgeführt. Die Bewertung der ermittelten Docking-Posen erfolgte mithilfe der in FlexX integrierten Scoring-Funktion.¹⁶⁹

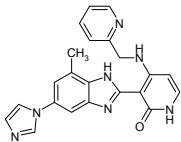
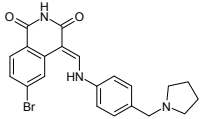
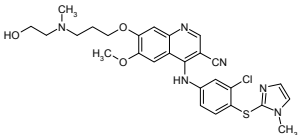
8.4.2 Docking mit ArgusLab

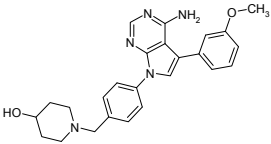
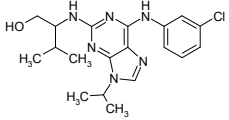
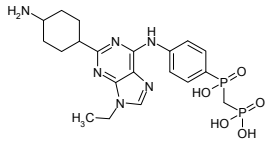
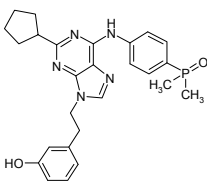
Die Docking-Experimente mit c-MET (PDB-ID: 3c1x¹⁰²) zum Design neuer Strukturen sowie die Docking-Experimente zur Untersuchung des Bindungsmodus der Verbindungen **27-29** in IGF-1R und SRC wurden von Dr. Lutz Preu (Institut für Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) mit dem frei verfügbaren Programm ArgusLab 4.0.1, Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, USA, durchgeführt.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Auswahl der Röntgenkristallstrukturen von IGF-1R und SRC

Die Auswahl der bei den hier durchgeführten Docking-Experimenten verwendeten Kristallstrukturen erfolgte auf Basis der in Tabelle 8-12 aufgeführten PDB-IDs. Für das Docking mit IGF-1R wurde 2zm3 verwendet. In dieser Struktur ist die Aminosäuresequenz vollständig aufgelöst. Als Grundlage für das Docking in SRC diente 2bdf. Im Vorfeld wurde eine Überlagerung der Kristallstrukturen von aktiven Formen von SRC mit gebundenem Inhibitor vorgenommen, welches keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kristallstrukturen zeigte. Von diesen weist 2bdf die höchste Auflösung auf.

Tabelle 8-12: Vergleich der für die Docking-Studien betrachteten Kristallstrukturen von IGF-1R und SRC

PDB-ID	Auflösung [Å]	Ligand	Aktivität	Nicht aufgelöste Bereiche	Referenz
IGF-1R					
1jqh	2.1	ATP-Analogon	aktiv	1098-1102; 1158-1164	Pautsch 2001 ²³
1k3a	2.1	ATP-Analogon	aktiv	1069-1076	Favelyukis 2001 ²¹
1m7n	2.7	-	inaktiv	1094-1099	Munshi 2002 ²²
1p4o	1.5	-	inaktiv	-	Munshi 2003 ¹⁷⁷
2oj9	2.0		n.e.	1068-1075	Velaparthi 2007 ¹⁵⁶
2zm3	2.5		inaktiv	-	Mayer 2008 ²⁴
3f5p	2.9		n.e.	1099-1103	Miller 2008 ¹⁷⁸
SRC					
1fmk	1.5	-	inaktiv	410-423	Xu 1997 ¹⁷⁹
2src	1.8	ATP-Analogon	inaktiv	-	Xu 1999 ¹⁸⁰
1yoj	1.95	-	aktiv	300-315; 406-426	Breitenlechner 2005 ³³

1yol	2.3		aktiv	407-426	Breitenlechner 2005 ³³
1yom	2.9		aktiv	407-425	Breitenlechner 2005 ³³
2bdf	2.1		aktiv	413-423	Dalgarno 2006 ¹⁵³
2bdj	2.5		aktiv	413-423	Dalgarno 2006 ¹⁵³

n.e.: nicht ermittelt

Vorbereitung der Liganden

Die Vorbereitung der Liganden erfolgte mithilfe des Programms HyperChem 8.0.4, Hypercube, Inc., Gainesville, Florida.¹⁸¹ Die Verbindungen wurden mit dem implementierten MM+ Kraftfeld auf einen RMS Gradienten von 0.1 kcal/Å x mol energieminimiert.

Vorbereitung der Proteine

Die Proteine wurden nach Entfernung der ursprünglichen Liganden ohne weitere Bearbeitung für das Docking eingesetzt.

Docking

Für das Docking wurden die Docking Engines ArgusDock und GADock verwendet.

Das in der Methodik den Programmen FRED¹⁸², DOCK¹⁸³ und GLIDE¹⁸² ähnelnde ArgusDock (ShapeDock) verwendet einen „exhaustive search“ Algorithmus. Dieser beruht auf der Identifizierung der komplementären räumlichen Gestalt von Ligand und Rezeptor und dem systematischen Absuchen des Konformationsraums. Für das Docking mit ArgusDock wurden folgende Parameter vorgegeben: *Grid resolution*: 0.4;

Ligand: flexible; Docking precision: normal; Augmented root node: Extend root node by 1 extra torsion.

GADock verwendet einen stochastischen Ansatz in Form eines genetischen Lamarck Algorithmus. Das Docking erfolgte mit den nachstehenden, zum Teil empirisch festgelegten Parametereinstellungen. *Grid resolution: 0.4; Ligand: flexible; Population size: 100; max. Generations: 1000; Mutation rate: 0.8; Crossover rate: 0.8; Elitism: 5.*

Die Bewertung der ermittelten Docking-Posen erfolgte mithilfe der in ArgusLab implementierten Scoring-Funktion *AScore*.

Zur Validierung der verwendeten Docking-Algorithmen wurde ein Redocking mit den jeweils in der Kristallstruktur kokristallisierten Liganden durchgeführt. Die Grenzen für den RMSD-Wert betrugen hierbei 2.0 Å bzw. 1.3 Å (*Ligand: flexible* bzw. *Ligand: rigid*).

Die Visualisierung der erhaltenen Docking-Lösungen erfolgte mit Chimera.¹²

9 Literaturverzeichnis

- [1] Kinnings, S. L., Jackson, R. M.: Binding site similarity analysis for the functional classification of the protein kinase family. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 318-329.
- [2] Cowan-Jacob, S. W.: Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 2608-2625.
- [3] Liao, J. J.-L.: Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1-16.
- [4] Zhang, J., Yang, P. L., Gray, N. S.: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 28-39.
- [5] Vulpetti, A., Bosotti, R.: Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Farmaco* **2004**, 59, 759-765.
- [6] Paul, M. K., Mukhopadhyay, A. K.: Tyrosine kinase - Role and significance in cancer. *Int. J. Med. Sci.* **2004**, 1, 101-115.
- [7] Alves, F., Hiddemann, W.: Tyrosinkinaseinhibitoren - Ein Ansatz zur pathogeneseorientierten Tumorthherapie. *Internist* **1997**, 38, 1074-1082.
- [8] Li, R., Pourpak, A., Worris, S. W.: Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4981-5004.
- [9] Patapoutian, A., Reichardt, L. F.: Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, 11, 272-280.
- [10] Finn, R. S.: Targeting Src in breast cancer. *Ann. Oncol.* **2008**, 19, 1379-1386.
- [11] Ghose, A. K., Herbertz, T., Pippin, D. A., Salvino, J. M., Mallamo, J. P.: Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5149-5171.
- [12] Petterson, E. F., Goddard, T. G., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
- [13] Jarvis, L. M.: One pill, many uses. *Chem. Eng. News* **2007**, 85, 15-23.
- [14] Christensen, J. G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., Lipson, K. E., Ramphal, J., Do, S., Cui, J. J., Cherrington, J. M., Mendel, D. B.: A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res.* **2003**, 63, 7345-7355.
- [15] Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., Salgia, R.: c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, 22, 309-325.

- [16] Birchmeier, C., Gherardi, E.: Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 404-410.
- [17] Dussault, I., Kaplan-Lefko, P., Jun, T., Coxon, A., Burgess, T. L.: HGF- and c-Met-targeted drugs: hopes, challenges and their future in cancer therapy. *Drugs Fut.* **2006**, 31, 819-825.
- [18] Sattler, M., Salgia, R.: The MET axis as a therapeutic target. *Update on Cancer Therapeutics* **2009**, 3, 109-118.
- [19] Bähr, C., Groner, B.: The insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) as a drug target: Novel approaches to cancer therapy. *Growth Hormone & IGF Research* **2004**, 14, 287-295.
- [20] Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D., Le Roith, D.: Signaling via the insulin-like growth factor-1 receptor: Does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* **1996**, 7, 153-159.
- [21] Favelyukis, S., Till, J. H., Hubbard, S. R., Miller, W. T.: Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 1058-1063.
- [22] Munshi, S., Kornienko, M., Hall, D. L., Reid, J. C., Waxman, L., Stirdivant, S. M., Darke, P. L., Kuo, L. C.: Crystal structure of the apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 38797-38802.
- [23] Pautsch, A., Zoephel, A., Ahorn, H., Spevak, W., Hauptmann, R., Nar, H.: Crystal structure of bisphosphorylated IGF-1 receptor kinase: Insight into domain movements upon kinase activation. *Structure* **2001**, 9, 955-965.
- [24] Mayer, S. C., Banker, A. L., Boschelli, F., Di, L., Johnson, M., Hess Kenny, C., Krishnamurthy, G., Kutterer, K., Moy, F., Petusky, S., Ravi, M., Tkach, D., Tsou, H., Xu, W.: Lead identification to generate isoquinolinedione inhibitors of insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) for potential use in cancer treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3641-3645.
- [25] Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J., Fujita-Yamaguchi, Y.: Insulin-like growth factor I receptor primary structure: Comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* **1986**, 5, 2503-2512.
- [26] Ferrara, N., Davis-Smith, T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **1997**, 18, 4-25.
- [27] Marmé, D.: Tumor angiogenesis: The pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J. Urol.* **1996**, 14, 166-174.
- [28] Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., Alitalo, K.: VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2009**, 21, 154-165.
- [29] Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers,

- B., Ross, R., Kabbinavar, F.: Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 2335-2342.
- [30] Crawford, Y., Ferrara, N.: VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell. Tissue Res.* **2009**, 335, 261-269.
- [31] Wang, T., Lamb, M. L., Scott, D. A., Wang, H., Block, M. H., Lyne, P. D., Lee, J. W., Davies, A. M., Zang, H., Zhu, Y., Gu, F., Han, Y., Wang, B., Mohr, P. J., Kaus, R. J., Josey, J. A., Hoffmann, E., Thress, K., MacIntyre, T., Wang, H., Omer, C. A., Yu, D.: Identification of 4-aminopyrazolylpyrimidines as potent inhibitors of Trk kinases. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4672-4684.
- [32] Pattarawarapan, M., Burgess, K.: Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5277-5291.
- [33] Breitenlechner, C. B., Kairies, N. A., Honold, K., Scheiblich, S., Koll, H., Greiter, E., Koch, S., Schäfer, W., Huber, R., Engh, R. A.: Crystal structures of active SRC kinase domain complexes. *J. Mol. Biol.* **2005**, 353, 222-231.
- [34] Hunter, T., Sefton, B. M.: Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, 77, 1311-1315.
- [35] Schwartzberg, P. L.: The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* **1998**, 17, 1463-1469.
- [36] Nowell, P. C.: Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 2033-2035.
- [37] Hazarika, M., Jiang, X., Liu, Q., Lee, S.-L., Ramchandani, R., Garnett, C., Orr, M. S., Sridhara, R., Booth, B., Leighton, J. K., Timmer, W., Harapanhalli, R., Dagher, R., Justice, R., Pazdur, R.: Tasigna for chronic and accelerated phase philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia resistant to or intolerant of Imatinib. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 5325-5331.
- [38] Abounader, R., Ranganathan, S., Lal, B., Fielding, K., Book, A., Dietz, H., Burger, P., Laterra, J.: Reversion of human glioblastoma malignancy by U1 small nuclear RNA/ribozyme targeting of scatter factor/hepatocyte growth factor and c-met expression. *J. Natl. Cancer I.* **1999**, 91, 1548-1556.
- [39] FDA: Label and approval history Avastin. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Search_Drug_Name, abgerufen am 11.12.2009.
- [40] Melnikova, I., Golden, J.: Targeting protein kinases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 993-994.
- [41] Fricke, I., Mirza, N., Dupont, J., Lockhart, C., Jackson, A., Lee, J.-H., Sosman, J. A., Gabrilovich, D. I.: Vascular endothelial growth factor-Trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune response. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 4840-4848.
- [42] Kaiser, P. K.: Vascular endothelial growth factor Trap-Eye for diabetic macular oedema. *Brit. J. Ophthalmol.* **2009**, 93, 135-136.

- [43] Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., Rudge, J. S.: VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 11393-11398.
- [44] Martinelli, E., De Palma, R., Orditura, M., De Vita, F., Ciardiello, F.: Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies on cancer therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, 158, 1-9.
- [45] Messersmith, W. A., Hidalgo, M.: Panitumumab, a monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibody in colorectal cancer: another one or the one? *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 4664-4666.
- [46] EMEA: Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht Herceptin. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Herceptin/H-278-de1.pdf>, abgerufen am 11.12.2009.
- [47] Medina, P. J., Goodin, S.: Lapatinib: A dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clin. Ther.* **2008**, 30, 1426-1447.
- [48] Petrelli, A., Giordano, S.: From single- to multi-target drugs in cancer therapy: When aspecificity becomes an advantage. *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 422-432.
- [49] Brockmann, M. A., Papadimitriou, A., Brandt, M., Fillbrandt, R., Westphal, M., Lamszus, K.: Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 4578-4585.
- [50] Kong-Beltran, M., Stamos, J., Wickramasinghe, D.: The sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* **2004**, 6, 75-84.
- [51] Lesko, E., Majka, M.: The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. *Front. Biosci.* **2008**, 13, 1271-1280.
- [52] Alton, G. R., Lunney, E. A.: Targeting the unactivated conformations of protein kinases for small molecule drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2008**, 3, 595-605.
- [53] Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H.: In: *Wirkstoffdesign*. 1. Aufl., **1996**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 78-80.
- [54] Rehm, H., Hammar, F.: In: *Biochemie light*. 2. Aufl., **2001**, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 25-27.
- [55] Klüter, S., Grütter, C., Naqvi, T., Rabiller, M., Simard, J. R., Pawar, V., Getlik, M., Rauh, D.: Displacement assay for the detection of stabilizers of inactive kinase conformations. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 357-367.
- [56] Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., Angiolini, M.: Through the "gatekeeper door": Exploiting the active kinase conformation. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2681-2694.

-
- [57] Bogoyevitch, M. A., Fairlie, D. P.: A new paradigm for protein kinase inhibition: Blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. *Drug Discov. Today* **2007**, 12, 622-633.
- [58] Morphy, R.: Selectively nonselective kinase inhibition: Striking the right balance. *J. Med. Chem.* **2009**, 53, 1413-1437.
- [59] Okram, B., Nagle, A., Adrián, F. J., Lee, C., Ren, P., Wang, X., Sim, T., Xie, Y., Wang, X., Xia, G., Spraggon, G., Warmuth, M., Liu, Y., Gray, N. S.: A general strategy for creating "inactive-conformation" Abl inhibitors. *Chem. Biol.* **2006**, 13, 779-786.
- [60] Akritopoulou-Zanze, I., Hajduk, P. J.: Kinase-targeted libraries: The design and synthesis of novel, potent, and selective kinase inhibitors. *Drug Discov. Today* **2009**, 14, 291-297.
- [61] Johnson, J. R., Bross, P., Cohen, M., Rothmann, M., Chen, G., Zajicek, A., Gobburu, J., Rahman, A., Staten, A., Pazdur, R.: Approval summary: Imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 1972-1979.
- [62] Hunter, T.: Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to Imatinib. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 2036-2043.
- [63] Brave, M., Goodman, V., Kaminskas, E., Farrell, A., Timmer, W., Pope, S., Harapanhalli, R., Saber, H., Morse, D., Bullock, J., Men, A., Noory, C., Ramchandani, R., Kenna, L., Booth, B., Gobburu, J., Jiang, X., Sridhara, R., Justice, R., Pazdur, R.: Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant or intolerant of Imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 352-359.
- [64] Stinchcombe, T. E., Socinski, M. A.: Gefitinib in advanced non-small cell lung cancer: Does it deserve a second chance? *Oncologist* **2008**, 13, 933-944.
- [65] Siebenand, S.: Gefitinib gegen Lungenkrebs. *Pharm. Ztg.* **2009**, 154, 3344-3345.
- [66] Cohen, M. H., Williams, G. A., Sridhara, R., Chen, G., McGuinn Jr., W. D., Morse, D., Abraham, S., Rahman, A., Liang, C., Lostritto, R., Baird, A., Pazdur, R.: United States Food and Drug Administration drug approval: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 1212-1218.
- [67] Comis, R. L.: The current situation: Erlotinib (Tarceva®) and Gefitinib (Iressa®) in non-small cell lung cancer. *Oncologist* **2005**, 10, 467-470.
- [68] Johnson, J. R., Cohen, M., Sridhara, R., Chen, Y.-F., Williams, G. M., Duan, J., Gobburu, J., Booth, B., Benson, K., Leighton, J., Hsieh, I. S., Chidambaram, N., Zimmerman, P., Pazdur, R.: Approval summary for Erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 6414-6421.

-
- [69] FDA: Label and approval history Tarceva. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Search_Drug_Name, abgerufen am 14.12.2009.
- [70] Kane, R. C., Farrell, A. T., Saber, H., Tang, S., Williams, G., Jee, J. M., Liang, C., Booth, B., Chidambaram, N., Morse, D., Sridhara, R., Garvey, P., Justice, R., Pazdur, R.: Sorafenib for treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 7271-7278.
- [71] FDA: Label and approval history Nexavar. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Search_Drug_Name, abgerufen am 14.12.2009.
- [72] Goodman, V. L., Rock, E. P., Dagher, R., Ramchandani, R. P., Abraham, S., Gobburu, J. V. S., Booth, B. P., Verbois, S. L., Morse, D. E., Liang, C. Y., Chidambaram, N., Jiang, J. X., Tang, S., Mahjoob, K., Justice, R., Pazdur, R.: Approval summary: Sunitinib for the treatment of Imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 1367-1373.
- [73] Bellmunt, J.: Sunitinib in advanced renal cell carcinoma: clinical evidence. *Eur. Urol. Suppl.* **2008**, 7, 585-592.
- [74] Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M. M., Cui, J., Perego, R., Rusconi, L., Cristiani, C.: Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 12654-12659.
- [75] Irwin, J. J., Shoichet, B. K.: ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 177-182.
- [76] Ma, Y., Yakushijin, K., Miyake, F., Horne, D.: A concise synthesis of indolic enamides: coscinamide A, coscinamide B, and igzamide. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 4343-4345.
- [77] Meanwell, N. A., Wallace, O. B., Fang, H., Wang, H., Deshpande, M., Wang, T., Yin, Z., Zhang, Z., Pearce, B. C., James, J., Yeung, K.-S., Qiu, Z., Wright, J. J. K., Yang, Z., Zadjura, L., Tweedie, D. L., Yeola, S., Zhao, F., Ranadive, S., Robinson, B. A., Gong, Y.-F., Wang, H.-G. H., Blair, W. S., Shi, P.-Y., Colonno, R. J., Lin, P.-F.: Inhibitors of HIV-1 attachment. Part 2: An initial survey of indole substitution patterns. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1977-1981.
- [78] Wang, T., Yin, Z., Zhang, Z., Bender, J. A., Yang, Z., Johnson, G., Yang, Z., Zadjura, L. M., D'Arienzo, C. J., DiGiugno Parker, D., Gesenberg, C., Yamanaka, G. A., Gong, Y.-F., Ho, H.-T., Fang, H., Zhou, N., McAuliffe, B. V., Eggers, B. J., Fan, L., Nowicka-Sans, B., Dicker, I. B., Gao, Q., Colonno, R. J., Lin, P.-F., Meanwell, N. A., Kadow, J. F.: Inhibitors of human immunodeficiency virus typ-1 (HIV-1) attachment. 5. An evolution from indole to azaindoles leading to the discovery of 1-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-2-(4,7-dimethoxy-1H-pyrrolo[2,3-c]-pyridin-3-yl)ethane-1,2-dione (BMS-488043), a drug candidate that demonstrates antiviral activity in HIV-1-infected subjects. *J. Med. Chem.* **2008**, 52, 7778-7787.

- [79] Thompson, M. J., Borsenberger, V., Louth, J. C., Judd, K. E., Chen, B.: Design, synthesis, and structure-activity relationship of indole-3-glyoxylamide libraries possessing highly potent activity in a cell line model of prion disease. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7503-7511.
- [80] Primofiore, G., Taliani, S., Da Settimo, F., Marini, A. M., La Motta, C., Simorini, F., Patrizi, M. P., Sergianni, V., Novellino, E., Greco, G., Cosimelli, B., Calderone, V., Montali, M., Besnard, F., Martini, C.: Novel *N*-substituted indol-3-ylglyoxylamides probing the L_{Di} and L_1/L_2 lipophilic regions of the benzodiazepine receptor site in search for subtype-selective ligands. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1627-1634.
- [81] Da Settimo, A., Primofiore, G., Da Settimo, F., Marini, A. M., Novellino, E., Greco, G., Gesi, M., Martini, C., Giannaccini, G., Lucacchini, A.: *N'*-phenylindol-3-ylglyoxylohydrazide derivatives: Synthesis, structure-activity relationships, molecular modeling studies, and pharmacological action on brain benzodiazepine receptors. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3821-3830.
- [82] Kumar, A., Agarwal, J. C., Nath, C., Gurtu, S., Sinha, J. N., Bhargava, K. P., Shanker, K.: Synthesis and biological activity of 2-substituted-3-ethyl-*N*-alkyl/arylindoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, 18, 1269-1271.
- [83] Primofiore, G., Da Settimo, F., Taliani, S., Marini, A. M., Novellino, E., Greco, G., Lavecchia, A., Besnard, F., Trincavelli, L., Costa, B., Martini, C.: Novel *N*-(arylalkyl)indol-3-ylglyoxylylamides targeted as ligands of the benzodiazepine receptor: Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling analysis of the structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2286-2297.
- [84] Rodios, N. A., Alexandrou, N. E.: Oxidation of 2-arylglyoxal-1-arylohydrazones with lead(IV)acetate; Preparation of unsymmetrically substituted triacylhydrazines. *Synthesis* **1982**, 824-825.
- [85] Buc, S. R.: The reaction of *N*-hydroxymethyl phthalimide with nitriles. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 254-256.
- [86] Gullickson, G. C., Lewis, D. E.: Synthesis of *N*-benzhydrylamides from nitriles by Ritter reactions in formic acid. *Synthesis* **2003**, 681-684.
- [87] Hellmann, H., Haas, G.: Kondensationen von *N*-Dialkylaminomethylbenzamidinen mit Aminen und Amidinen. *Chem. Ber.* **1957**, 90, 50-53.
- [88] Cherkasov, R. A., Kuttyrev, G. A., Pudovik, A. N.: Organothiophosphorus reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **1985**, 41, 2567-2624.
- [89] Eychenne, V., Mouloungui, Z.: Convenient thionation of triglycerides with Lawesson's reagent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78, 229-234.
- [90] Kosugi, Y., Kosugi, M., Hamaguchi, F.: Synthesis of 2,2-disubstituted succinimides and their regioselective thiocarbonylation reaction. *Heterocycles* **1989**, 29, 435-440.
- [91] Scheibye, S., El-Barbary, A. A., Lawesson, S.-O.: Studies on organophosphorus compounds. XLI. Formation of 3-pyrazoline-5-thione disulfides from 3,5-

- pyrazolidinediones. C-Alkylation of 3,5-pyrazolidinediones. *Tetrahedron* **1982**, 38, 3753-3760.
- [92] Yde, B., Yousif, N. M., Pederson, U., Thomsen, I., Lawesson, S.-O.: Studies on organophosphorus compounds. XLVII. Preparation of thiated synthons of amides, lactams and imides by use of some new P, S-containing reagents. *Tetrahedron* **1984**, 40, 2047-2052.
- [93] Zhu, X., Greig, N. H., Yu, Q., Utsuki, T., Holloway, H. W., Lahiri, D. K., Brossi, A.: Synthesis of 3-alkylidene-isoindolinones via sulphide contraction. *Heterocycles* **2004**, 64, 93-99.
- [94] Porter, J. C., Robinson, R., Wyler, M.: Monothiophthalimide and some derivatives of oxindole. *J. Chem. Soc.* **1941**, 620-624.
- [95] MestReNova 6.0.3, Mestrelab Research S.L., 1575 Tanglewood Ln, CA, USA, <http://www.mestrelab.com>.
- [96] Stýskala, J., Lycka, A., Slouka, J.: Synthesis of some [1,2,4]triazino[5,6-*b*]quinoline derivatives [1]. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, 39, 1305-1308.
- [97] Pal, M., Batchu, V. R., Parasuraman, K., Yeleswarapu, K. R.: Aluminium chloride-induced heteroarylation of arenes and heteroarenes. 2. A new synthesis of 4-substituted phthalazin-1(2*H*)-ones. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6806-6809.
- [98] Guery, S., Parrot, I., Rival, Y., Wermuth, C. G.: Synthesis of 4-aryl-1-(4-methylpiperazin-1-yl)phthalazines by Suzuki-type cross-coupling reaction. *Synthesis* **2001**, 699-701.
- [99] Mahmoud, N. A.: Synthesis of some 3,8-disubstituted phthalazines and their biological activities. *Egypt. J. Chem.* **2005**, 48, 251-257.
- [100] Khan, K. M., Rasheed, M., Ullah, Z., Hayat, S., Kaukab, F., Choudhary, M. I., ur-Rahman, A., Perveen, S.: Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 1381-1387.
- [101] Sung, K., Lee, A.-R.: Synthesis of [(4,5-disubstituted-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio]alkanoic acids and their analogues as possible antiinflammatory agents. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, 29, 1101-1109.
- [102] Schroeder, G. M., Chen, X., Williams, D. K., Nirschl, D. S., Cai, Z., Wei, D., Tokarski, J. S., An, Y., Sack, J., Chen, Z., Huynh, T., Vaccaro, W., Poss, M., Wautlet, B., Gullo-Brown, J., Kellar, K., Manne, V., Hunt, J. T., Wong, T. W., Lombardo, L. J., Fagnoli, J., Borzilleri, R. M.: Identification of pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazine-based inhibitors of met kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1945-1951.
- [103] Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J.: The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279-282.
- [104] Giguere, R. J., Bray, T. L., Duncan, S. M.: Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945-4948.

-
- [105] de la Hoz, A., Díaz-Ortiz, Á., Moreno, A.: Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 164-178.
- [106] Kappe, C. O.: Kontrolliertes Erhitzen mit Mikrowellen in der modernen organischen Synthese. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6408-6443.
- [107] Baghurst, D. R., Mingos, D. M. P.: Superheating effects associated with microwave dielectric heating. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 674-677.
- [108] Chemat, F., Esveld, E.: Microwave super-heated boiling of organic liquids: Origin, effect and application. *Chem. Eng. Technol.* **2001**, 24, 735-744.
- [109] Leadbeater, N. E., Marco, M.: Rapid and amenable Suzuki coupling reaction in water using microwave and conventional heating. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 888-892.
- [110] Singh, B. K., Kaval, N., Tomar, S., Van der Eycken, E., Parmar, V. S.: Transition metal-catalyzed carbon-carbon bond formation Suzuki, Heck, and Sonogashira reactions using microwave and microtechnology. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12, 468-747.
- [111] Chanthavong, F., Leadbeater, N. E.: The application of organic bases in microwave-promoted Suzuki coupling reactions in water. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1909-1912.
- [112] Milstein, D., Stille, J. K.: A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 3636-3638.
- [113] Dieck, H. A., Heck, R. F.: Organophosphinepalladium complexes as catalysts for vinylic hydrogen substitution reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1133-1136.
- [114] Miyaura, N., Suzuki, A.: Stereoselective synthesis of arylated (*E*)-Alkenes by reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866-867.
- [115] Miyaura, N., Suzuki, A.: Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- [116] Punna, S., Díaz, D. D., Finn, M. G.: Palladium-catalyzed homocoupling of arylboronic acids and esters using fluoride in aqueous solvents. *Synlett* **2004**, 2351-2354.
- [117] Kotha, S., Lahiri, K., Kashinath, D.: Recent application of the Suzuki-Miyaura cross coupling reaction in organic synthesis. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9633-9695.
- [118] Martin, A. R., Yang, Y.: Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboronic acids with organic electrophiles. *Acta Chem. Scand.* **1993**, 47, 221-230.
- [119] Amatore, C., Jutand, A.: Mechanistic and kinetic studies of palladium catalytic systems. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 576, 254-278.

- [120] Amatore, C., Jutand, A., Khalil, F., M'Barki, M. A., Mottier, L.: Rates and mechanisms of oxidative addition to zerovalent palladium complexes generated in situ from mixtures of $\text{Pd}^0(\text{dba})_2$ and triphenylphosphine. *Organometallics* **1993**, 12, 3168-3178.
- [121] Köhler, K., Kleist, W., Pröckl, S. S.: Genesis of coordinatively unsaturated palladium complexes dissolved from solid precursors during Heck coupling reactions and their role as catalytically active species. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 1876-1883.
- [122] Amatore, C., Jutand, A.: Anionic $\text{Pd}(0)$ and $\text{Pd}(\text{II})$ intermediates in palladium-catalyzed Heck and cross-coupling reactions. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 314-321.
- [123] Amatore, C., Jutand, A., Suarez, A.: Intimate mechanism of oxidative addition to zerovalent palladium complexes in the presence of halide ions and its relevance to the mechanism of palladium-catalyzed nucleophilic substitutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9531-9541.
- [124] Jefferey, T.: Highly stereospecific palladium-catalysed vinylation of vinylic halides under solid-liquid phase transfer conditions. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 2667-2670.
- [125] Espinet, P., Echavarren, A. M.: Die Mechanismen der Stille-Reaktion. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4808-4839.
- [126] Nishikata, T., Lipshutz, B. H.: Allylic ethers for Suzuki-Miyaura couplings in water at room temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12103-12105.
- [127] Quasdorf, K. W., Riener, M., Petrova, K. V., Garg, N. K.: Suzuki-Miyaura coupling of aryl carbamates, carbonates, and sulfamates. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17748-17749.
- [128] Tobisu, M., Shimasaki, T., Chatani, N.: Nickel-catalyzed cross-coupling of aryl methyl ethers with aryl boronic esters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4866-4869.
- [129] Thathagar, M. B., Beckers, J., Rothenberg, G.: Copper-catalyzed Suzuki cross-coupling using mixed nanocluster catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11858-11859.
- [130] Han, J., Liu, Y., Guo, R.: Facile synthesis of highly stable gold nanoparticles and their unexpected excellent catalytic activity for Suzuki-Miyaura cross coupling reaction in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2060-2061.
- [131] Lai, Y.-C., Chen, H.-Y., Hung, W.-C., Lin, C.-C., Hong, F.-E.: Palladium catalyzed Suzuki cross-coupling reactions using *N,O*-bidentate ligands. *Tetrahedron* **2005**, 61, 9484-9489.
- [132] Bedford, R. B., Blake, M. E., Butts, C. P., Holder, D.: The Suzuki coupling of aryl chlorides in TBAB-water mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, 466-467.

- [133] Littke, A. F., Dai, C., Fu, G. C.: Versatile catalysts for the Suzuki cross-coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4020-4028.
- [134] Miao, G., Ye, P., Yu, L., Baldino, C. M.: Microwave-promoted Suzuki reactions of aryl chlorides in aqueous media. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2332-2334.
- [135] Miura, M.: Rational ligand design in constructing efficient catalyst systems for Suzuki-Miyaura coupling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2201-2203.
- [136] Rocaboy, C., Gladysz, J. A.: Thermomorphing fluorine imine and thioether palladacycles as precursors for highly active Heck and Suzuki catalysts; Evidence for palladium nanoparticle pathways. *New J. Chem.* **2003**, 27, 39-49.
- [137] Scheuermann, G. M., Rumi, L., Steurer, P., Bannwarth, W., Mülhaupt, R.: Palladium nanoparticles on graphite oxide and its functionalized graphene derivatives as highly active catalysts for the Suzuki-Miyaura coupling reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 8262-8270.
- [138] Snelders, D. J., van Koten, G., Klein Gebbink, R. J. M.: Hexacationic *Dendriphos* ligands in the Pd-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction: Scope and mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11407-11416.
- [139] Wang, J.-W., Meng, F.-H., Zhang, L.-F.: Suzuki coupling reaction of aryl halides catalyzed by an *N*-heterocyclic carbene-PdCl₂ species based on a porphyrin at room temperature. *Organometallics* **2009**, 28, 2334-2337.
- [140] Zapf, A., Jackstell, R., Rataboul, F., Riermeier, T., Monsees, A., Fuhrmann, C., Shaikh, N., Dingerdissen, U., Beller, M.: Practical synthesis of new and highly efficient ligands for the Suzuki reaction of aryl chlorides. *Chem. Commun.* **2004**, 38-39.
- [141] Zhang, C., Trudell, M. L.: Palladium-bisimidazol-2-ylidene complexes as catalysts for general and efficient Suzuki cross-coupling reactions of aryl chlorides with arylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 595-598.
- [142] Zhang, X., Qiu, Y., Rao, B., Luo, M.: Palladium(II)-*N*-heterocyclic carbene metallocrown ether complexes: Synthesis, structure, and catalytic activity in the Suzuki-Miyaura reaction. *Organometallics* **2009**, 28, 3093-3099.
- [143] Leadbeater, N. E., Marco, M.: Transition-metal-free Suzuki-type coupling reactions: Scope and limitations of the methodology. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5660-5667.
- [144] Bröll, D., Kaul, C., Krämer, A., Krammer, P., Richter, T., Jung, M., Vogel, H., Zehner, P.: Chemie in überkritischen Wasser. *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3180-3196.
- [145] Kremsner, J. M., Kappe, C. O.: Microwave-assisted organic synthesis in near-critical water at 300 °C. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3672-3679.
- [146] Van Zandt, M. C., Jones, M. L., Gunn, D. E., Geraci, L. S., Jones, J. H., Sawicki, D. R., Sredy, J., Jacot, J. L., DiCioccio, A. T., Petrova, T., Mitschler, A., Podjarny, A. D.: Discovery of 3-[(4,5,7-trifluorobenzothiazol-2-yl)methyl]indole-*N*-acetic acid

- (Lidorestat) and congeners as highly potent and selective inhibitors of aldose reductase for treatment of chronic diabetic complications. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3141-3152.
- [147] Primofiore, G., Da Settimo, F., Taliani, S., Simorini, F., Patrizi, M. P., Novellino, E., Greco, G., Abignente, E., Costa, B., Chelli, B., Martini, C.: *N,N*-Dialkyl-2-phenylindol-3-glyoxylamides. A new class of potent and selective ligands at the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1852-1855.
- [148] Bagley, M. C., Moody, C. J., Pepper, A. G.: Studies towards the synthesis of diazonamide A. Synthesis of the 4-(oxazol-5-ylmethyl) aryltryptamine fragment. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6901-6904.
- [149] D'Angelo, N. D., Bellon, S. F., Booker, S. K., Cheng, Y., Coxon, A., Dominguez, C., Fellows, I., Hoffman, D., Hungate, R., Kaplan-Lefko, P., Lee, M. R., Li, C., Liu, L., Rainbeau, E., Reider, P. J., Rex, K., Siegmund, A., Sun, Y., Tasker, A. S., Xi, N., Xu, S., Yang, Y., Zhang, Y., Burgess, T. L., Dussault, I., Kim, T.: Design, synthesis and biological evaluation of potent c-met inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5766-5779.
- [150] Bellon, S. F., Kaplan-Lefko, P., Yang, Y., Zhang, Y., Moriguchi, J., Rex, K., Johnson, C. W., Rose, P. E., Long, A. M., O'Connor, A., Gu, Y., Coxon, A., Kim, T.-S., Tasker, A., Burgess, T. L., Dussault, I.: c-Met inhibitors with novel binding mode show activity against hereditary papillary renal cell carcinoma-related mutations. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 2675-2683.
- [151] Wang, W., Marimuthu, A., Tsai, J., Kumar, A., Krupka, H. I., Zhang, C., Powell, B., Suzuki, Y., Nguyen, H., Tabrizizad, M., Luu, C., West, B. L.: Structural characterization of autoinhibited c-met kinase produced by coexpression in bacteria with phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 3563-3568.
- [152] NCI: Molecular Target Data Application. <http://dtp.nci.nih.gov/mtweb/index.jsp>, abgerufen am 15.03.2010.
- [153] Dalgarno, D., Stehle, T., Narula, S., Schelling, P., van Schravendijk, M. R., Susan, A., Andrade, L., Keats, J., Ram, M., Jin, L., Grossman, T., MacNeil, I., Metcalf III, C., Shakespeare, W., Wang, Y., Keenan, T., Sundaramoorthi, R., Bohacek, R., Weigele, M., Sawyer, T.: Structural basis of SRC tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, 67, 46-57.
- [154] Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Manley, P. W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., Meyer, T.: The crystal structure of a c-SRC complex in an active conformation suggests possible steps in c-SRC activation. *Structure* **2005**, 13, 861-871.
- [155] Lee, K., Kim, J., Jeong, K.-W., Lee, K. W., Lee, Y., Song, J. Y., Kim, M. S., Lee, G. S., Kim, Y.: Structure-based virtual screening of SRC kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 3152-3161.
- [156] Velaparthi, U., Wittman, M., Liu, P., Stoffan, K., Zimmerman, K., Sang, X., Carboni, J., Li, A., Attar, R., Gottardis, M., Greer, A., Chang, C. Y., Jacobsen, B. L., Sack, J. S., Sun, Y., Langley, D. R., Balasubramanian, B., Vyas, D.:

- Discovery and initial SAR of 3-(1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)pyridin-2(1*H*)-ones as inhibitors of insulin-like growth factor 1-receptor (IGF-1R). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2317-2321.
- [157] Wu, J., Li, W., Craddock, B. P., Foreman, K. W., Mulvihill, M. J., Ji, Q.-S., Miller, W. T., Hubbard, S. R.: Small-molecule inhibition and activation-loop *trans*-phosphorylation of the IGF1 receptor. *EMBO J.* **2008**, 27, 1985-1994.
- [158] Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: Purification of laboratory chemicals. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, USA.
- [159] Da Settimo, A., Primofiore, G., Da Settimo, F., Marini, A. M., Novellino, E., Greco, G., Martini, C., Giannaccini, G., Lucacchini, A.: Synthesis, structure-activity relationships, and molecular modeling studies of *N*-(indol-3-ylglyoxylyl)benzylamine derivatives acting at the benzodiazepine receptor. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 5083-5091.
- [160] Bianucci, A. M., Da Settimo, A., Da Settimo, F., Primofiore, G., Martini, C., Giannaccini, G., Lucacchini, A.: Benzodiazepine receptor affinity and interaction of some *N*-(indol-3-ylglyoxylyl)amine derivatives. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2214-2220.
- [161] Unterhalt, B.: Über die Darstellung von *N*-Phthalimidomethyl- und *N*-Benzoessäuresulfimidomethyl-*N*-acyl-aminen. *Arch. Pharm.* **1967**, 300, 247-249.
- [162] Aboul-Fadl, T., Abdel-Hamid, Mohammed, F., Abdel-Saboour Hassan, E.: Synthesis, antitubercular activity and pharmacokinetic studies of some Schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide (INH). *Arch. Pharm. Res.* **2003**, 26, 778-784.
- [163] Maqsood, Z. T., Khan, K. M., Ashiq, U., Jamal, R. A., Chohan, Z. H., Mahroof-Tahir, M., Supuran, C. T.: Oxovanadium(IV) complexes of hydrazides: potential antifungal agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2006**, 21, 37-42.
- [164] Ballantine, J. A., Barrett, C. B., Beer, R. J. S., Boggiano, B. G., Clarke, K., Eardley, S., Jennings, B. E., Robertson, A.: The chemistry of bacteria. Part IV. A C₂₀-acid from violacein. *J. Chem. Soc.* **1957**, 2222-2227.
- [165] Isgör, Y. G., Kilic, Z., Ölgün, S.: Novel aminomethylindole derivatives as inhibitors of pp60^{c-Src} tyrosine kinase: Synthesis and biological activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, 72, 599-604.
- [166] Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R.: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67-73.
- [167] FlexX, BioSolveIT, Sankt Augustin, <http://www.biosolveit.de>.
- [168] Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G.: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 470-489.
- [169] Sousa, S. F., Fernandes, P. A., Ramos, M. J.: Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins* **2006**, 65, 15-26.

- [170] Rishton, G. M.: Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 86-96.
- [171] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3-26.
- [172] Sadowski, J., Gasteiger, J.: Comparison of automatic three-dimensional model builders using 639 X-ray structures. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, 34, 1000-1008.
- [173] Sybyl 7.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, USA, <http://www.tripos.com>.
- [174] ArgusLab 4.0.1, Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, <http://www.arguslab.com>.
- [175] Oda, A., Okayasu, M., Kamiyama, Y., Yoshida, T., Takahashi, O., Matsuzaki, H.: Evaluation of docking accuracy and investigations of roles of parameters and each term in scoring functions for protein-ligand docking using ArgusLab software. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, 80, 1920-1925.
- [176] Yanamala, N., Tirupula, K. C., Klein-Seetharaman, J.: Preferential binding of allosteric modulators to active and inactive conformational states of metabotropic glutamate receptors. *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, Suppl. 1: S16.
- [177] Munshi, S., Hall, D. L., Kornienko, M., Darke, P. L., Kuo, L. C.: Structure of apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase at 1.5 Å resolution. *Acta Cryst.* **2003**, D59, 1725-1730.
- [178] Miller, L. M., Mayer, S. C., Berger, D. M., Boschelli, D. H., Boschelli, F., Di, L., Du, X., Dutia, M., Floyd, M. B., Johnson, M., Kenny, C. H., Krishnamurthy, G., Moy, F., Petusky, S., Tkach, D., Torres, N., Wu, B., Xu, W.: Lead identification to generate 3-cyanoquinoline inhibitors of insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) for potential use in cancer treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 62-65.
- [179] Xu, W., Harrison, S. C., Eck, M. J.: Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-SRC. *Nature* **1997**, 385, 595-602.
- [180] Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., Harrison, S. C.: Crystal structure of c-SRC reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell.* **1999**, 3, 629-638.
- [181] HyperChem 8.0.4, Hypercube, Inc., Gainesville, Florida, <http://www.hyper.com>.
- [182] McGaughey, G. B., Sheridan, R. P., Bayly, C. I., Culberson, J. C., Kretsoulas, C., Lindsley, S., Maiorov, V., Truchon, J.-F., Cornell, W. D.: Comparison of topological, shape, and docking methods in virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 1504-1519.
- [183] Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., Ferrin, T. E.: A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **1982**, 161, 269-288.

Danksagung

Für die Durchführung der biologischen Testungen möchte ich mich bei Herrn Dr. J. E. Ehlert, Herrn Dr. M. H. G. Kubbutat, Herrn Dr. C. Schächtele, Herrn Dr. F. Totzke und der Firma ProQinase GmbH, Freiburg, sowie den Mitarbeitern des National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Matthias Rarey, Zentrum für Bioinformatik der Universität Hamburg, und Herrn Dr. T. Lemcke, Institut für Pharmazie der Universität Hamburg, für die Durchführung des virtuellen Screenings. Herrn Dr. T. Lemcke danke ich darüber hinaus für die Durchführung weiterer Docking-Studien.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. L. Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die Durchführung von Docking-Experimenten sowie die stete Hilfsbereitschaft und die wertvolle fachliche Unterstützung bei analytischen Fragestellungen aussprechen.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom und Frau P. Holba-Schulz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie Herrn Dr. U. Papke, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek, Massenspektrometrie-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen danken.

Mein Dank gilt zudem den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich für die Anfertigung der FT-IR-Spektren und der Elementaranalysen sowie für die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente und die biologischen Testungen. Bei den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roesse und Herrn M. Söchtig möchte ich mich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten und ihre technische Unterstützung bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit und die angenehme, kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meines Arbeitskreises Frau Dr. U. Dunkel, Frau Dr. B. Berger, Herrn Dr. H. Stukenbrock, Frau

Dr. T. Reichwald, Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Frau Dr. A. Becker, Frau Dr. W. Brandt, Frau N. Tolle, Frau J. Ryczak, Frau R. Determann, Frau A. Lader, Herrn H. Falke sowie Frau C. Anthes aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. K. Baumann. Zudem möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei Herrn Dr. L. Preu und den Kollegen des 8. Semesters Frau Dr. T. Reichwald, Herrn F. Kölling, Frau J. Ryczak, Frau S. Redweik, Frau M. Isedor und Frau S. Lucka für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit im Praktikum „Arzneimittelanalytik (Drug Monitoring, toxikologische und umweltrelevante Untersuchungen)“ bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau R. Determann und Herrn Dr. L. Preu für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen.

Lebenslauf

Name	Stefanie Schmidt geb. Lütge
Geburtsdatum	23. Februar 1982
Geburtsort	Celle
1988 – 1992	Grundschule Wettmar
1992 – 1994	Orientierungsstufe Großburgwedel
1994 – 2001	Gymnasium Großburgwedel
06/2001	Allgemeine deutsche Hochschulreife
10/2001 – 10/2005	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
11/2005 – 05/2006	Pharmaziepraktikum, Ulrici-Apotheke, Braunschweig
06/2006 – 11/2006	Pharmaziepraktikum, Schering AG, Berlin
01/2007	Approbation als Apothekerin
seit 02/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick
04/2010	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik